

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE QUÍMICA ANALÍTICA



TESIS DOCTORAL

**Determinación de elementos traza en cabello de población infantil y
relación entre los niveles de mercurio y el consumo de pescado**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Teresa Llorente Ballesteros

Directores

Rafael Lozano Fernández
José Luis López-Colón

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



**DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA EN
CABELLO DE POBLACIÓN INFANTIL Y RELACIÓN
ENTRE LOS NIVELES DE MERCURIO Y EL
CONSUMO DE PESCADO**

MARÍA TERESA LLORENTE BALLESTEROS

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



**DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA EN
CABELLO DE POBLACIÓN INFANTIL Y RELACIÓN
ENTRE LOS NIVELES DE MERCURIO Y EL
CONSUMO DE PESCADO**

MARÍA TERESA LLORENTE BALLESTEROS

DIRECTORES

DR. D. RAFAEL LOZANO FERNÁNDEZ

DR. D. JOSÉ LUIS LÓPEZ COLÓN

Rafael Lozano Fernández, Catedrático del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y **José Luis López Colón**, Profesor Asociado de la Sección Departamental de Química Analítica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

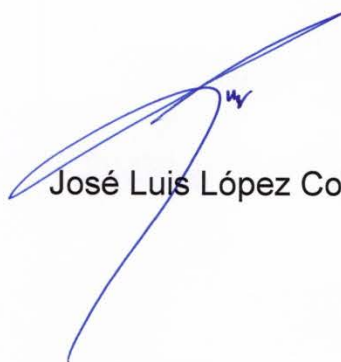
Que el presente trabajo titulado "**DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA EN CABELLO DE POBLACIÓN INFANTIL Y RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MERCURIO Y EL CONSUMO DE PESCADO**" llevado a cabo por **DÑA. MARÍA TERESA LLORENTE BALLESTEROS** ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Consideramos que el mencionado trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido ante el Tribunal designado para la obtención del grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Madrid a 28 de septiembre de 2012



Rafael Lozano Fernández



José Luis López Colón

Me gustaría dedicar esta Tesis a toda mi familia.

A mis padres, por ayudarme a crecer como persona, inculcándome los valores y principios que irán conmigo a lo largo de mi camino.

A mi esposo, Ángel, por su labor callada, siempre a mi lado, con grandes dosis de amor y generosidad

Para mi hijo, Álvaro, quien es mi motor, llenando mi vida de felicidad.

A mis hermanos, mis grandes amigos. Siempre estáis cuando os necesito.

A todos ellos

Muchas gracias de todo corazón

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que quiero expresar mi gratitud.

En primer lugar todo mi agradecimiento al Dr. D. Rafael Lozano Fernández, por aceptar la dirección de esta tesis y haber depositado en mí su confianza.

Al Dr. D. José Luis López Colón, por haberme orientado en la tarea investigadora, mostrando un constante e inestimable apoyo y entusiasmo en el proyecto.

Al Dr. D. Carlos Gutiérrez, a quien considero mi amigo, por su generosa ayuda en el desarrollo de este trabajo, pero especialmente por su constante apoyo y estímulo.

A todo el servicio de Medicina Preventiva del Hospital Gómez Ulla por su ánimo y comprensión.

A Chus y Toñi por su generosidad en el trabajo, haciéndome fácil lo difícil.

A todos los componentes del Instituto de Toxicología de la Defensa por su disponibilidad y apoyo en todo momento.

A mis compañeros y amigos que, directa o indirectamente, han estado a mi lado en todo este tiempo.

Por último, a todos aquellos niños y a sus padres (participantes anónimos) que aceptaron colaborar de forma desinteresada, sin los que no se habría podido llevar a cabo este estudio.

Abreviaturas y acrónimos:

ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades “Agency for Toxic Substances and Disease Registry”. Estados Unidos
BAL	Agente quelante “British anti Lewisite”.
CDC	Centros de Control y Prevención de Enfermedades Estados Unidos “Centers for Disease Control and Prevention”
CI	Coeficiente o cociente Intelectual
CHMS	Sistema de Monitorización de la Salud Canadiense “Canadian Health measure survey”
CVAAS	Espectrometría de absorción atómica y vapor frío “Cold Vapor Atomic Absortion Spectrometry”
CEHAPE	Plan de Acción Europea para la Salud de los Niños y el Medioambiente
DMPS	Acido 2,3 – dimercapto – 1 – propano – sulfónico. Agente quelante
EDTA	Etilen Diamino Tetraacético. Agente quelante
EFSA	Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
EPA	Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos “Environmental Protection Agency”
EROS	Especies reactivas de oxígeno.
ESBIO	Grupo de expertos para la biomonitorización en Europa “Expert team to support biomonitoring Europe”
ETAAS	Espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica
EE.UU	Estados Unidos de America
EURAMIC	European Community multicenter study on Antioxidants, Miocardial Infarction and Breast Cancer
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación “Food and Agriculture Organization”

GERES	Plan Nacional de Biomonitorización Aleman. “German Environmental survey”
GSH	Glutation
HBC	Comisión para la Biomonitorización Humana en Alemania
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IAEA	Agencia Internacional de Energía Atómica
IC	Intervalo de Confianza
IFCC	Federación Internacional de Química Clínica y Laboratorio Clínico
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
ICP- MS	Plasma acoplado inducido con detector de Masas
INSHT	Instituto Nacional de Salud e Higiene en el Trabajo
JECFA	“Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives” Comité conjunto de expertos FAO y Organización Mundial de la Salud de aditivos alimentarios y contaminantes
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad “Low Density Lipoproteins”
LED	Diodos que Emiten Luz
LD	Límite de Detección
LC	Límite de cuantificación
MCV	Monómeros de cloruro de vinilo
MeHg	Metilmercurio
MMT	Metilciclopentadienilo-Manganeso Tricarbonilo. Antidetonante en gasolina.
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido Fosfato
NAS	Academia Nacional de Ciencias de EEUU.
NHANES	“National Health and Nutrition Examination Survey” Encuesta de salud y nutrición de Estados Unidos
NOAEL	No efectos adversos observables “Non Observed Adverse Effects Level”
NRC	Consejo de Investigación Nacional de Estados Unidos

OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud “World Health Organization”
OSHA	Administración para la Salud y Seguridad en el Trabajo “Occupational Safety and Health Administration”
PCBs	Bifenilos policlorados
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
PTWI	Ingesta provisional tolerable semanal “Provisional Weekly Tolerable Intake”
RDA	Ingesta Diaria Recomendada
RfD	Dosis de Referencia
ROS	Radicales Libres
SCOOP	Tarea de Cooperación Científica “Scientific Co-operation Task”
SCALE	Estrategia Europea de Medioambiente y Salud
SNC	Sistema Nervioso Central
T3	Triyodotironina
T3r	Triyodotironina inversa
T4	Tiroxina
TSH	Tirotropina
UE	Unión Europea
VLA-ED	Valor Límite Ambiental para la Exposición Diaria
VLB	Valor Límite Biológico

Índice:

1. Introducción.....	2
1.1 Antecedentes.....	2
1.2 Elementos traza.....	10
1.3 Metabolismo elementos traza.....	11
1.3.1 Absorción.....	13
1.3.2 Transporte plasmático.....	15
1.3.3 Distribución y excreción.....	16
1.3.4 Requerimientos dietéticos y nutrición.....	16
1.4 Toxicología de los elementos traza.....	18
1.4.1 Fuentes de exposición.....	18
1.4.2 Factores toxicocinéticos.....	21
1.4.3 Mecanismo de acción tóxica.....	24
1.4.4 Efectos sobre la salud.....	25
1.4.5 Formación de complejos como posibilidad de tratamientos.....	27
1.5 Mercurio.....	29
1.5.1 Antecedentes.....	29
1.5.2 Comités internacionales. Problema de Salud Pública.....	30
1.5.3 Fuentes de exposición.....	33
1.5.4 Toxicocinética.....	38
1.5.5 Efectos sobre la salud.....	43

1.6. El pelo como matriz	53
1.6.1 Anatomía y fisiología del pelo.....	57
1.6.2 Fases de crecimiento del pelo	59
1.6.3 Factores que influyen en los niveles de elementos traza en pelo.....	60
1.7 Vulnerabilidad de la población infantil	63
1.7.1 Alteraciones del desarrollo neurológico en relación con el medio ambiente.	63
1.7.2 Evidencias científicas	66
2. Objetivos	71
3. Material y métodos	75
3.1 Diseño del estudio	75
3.2 Población de estudio	75
3.3 Cálculo del tamaño muestral.....	75
3.4 Criterios de inclusión.....	76
3.5 Selección de la muestra	76
3.6 Período de estudio	77
3.7 Variables	77
3.8 Recogida de datos	80
3.9 Consideraciones éticas.....	81
3.10 Valores de referencia	81
3.11 Metodología.....	82
3.11.1 Recolección de muestras (cabello)	82
3.11.2 Análisis de muestras	82

3.11.3 Técnicas Analíticas.....	83
3.11.4. Estudio de validación	105
3.12 Método estadístico	119
3.12.1 Estadística descriptiva	119
3.12.3 Estadística inferencial.....	121
4. Resultados.....	123
4.1 Características de la población estudiada	123
4.2 Concentración de elementos traza en pelo	127
4.3 Variaciones en función de la edad	132
4.4 Variaciones en función del sexo.....	143
4.5 Variaciones en función de la edad y el sexo	148
4.6 Variaciones en grupos etarios diferentes en función del sexo	160
4.7 Estudios de correlación	165
4.8 Estudios de prevalencia.....	175
4.9 Estudio del Hg.....	177
4.9.1 Variación en función de la edad.....	177
4.9.2 Variaciones del Hg en función del sexo y los grupos etarios	178
4.9.3 Estudio de Correlaciones.....	179
4.9.4 Variaciones del Hg en función de la edad y el consumo de pescado	182
4.9.5 Estudio de los niveles de Hg en relación con los establecidos por diferentes Comités internacionales	190
5. Discusión	197

5.1 Consideraciones sobre Valores de Referencia	199
5.2 Consideraciones sobre Mercurio	210
5.3 Consideraciones finales	237
6. Conclusiones	243
7. Bibliografía.	246
8. Anexos:	270

Índice de tablas:

Tabla 1 Listado de sustancias peligrosas establecido por la ATSDR	5
Tabla 2 Metales de menor peso atómico que el Cu	10
Tabla 3 Comparación de las ingestas diarias estimadas de cada elemento para cada grupo de población con los valores saludables de las guías correspondientes ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ peso corporal/día.).....	17
Tabla 4 Recomendaciones realizadas por la AESAN, en 2011, a los grupos más vulnerables de la población.....	32
Tabla 5 Perkin Elmer Elan DRC PLUS.....	96
Tabla 6 Programa de inyección de flujo utilizado en el equipo de análisis de mercurio.....	102
Tabla 7 Límites de Detección y Cuantificación en función del peso de la muestra.....	104
Tabla 8 Valores de las concentraciones de n: 30 réplicas de un blanco de calibración para el elemento Ag.....	106
Tabla 9 Representación del Límite de Detección LD, Límite de Cuantificación LC y Coeficiente de Correlación r.....	107
Tabla 10 Resultados de controles de pelo para evaluar exactitud y precisión	112
Tabla 11 Resultados de controles de Hg en pelo para evaluar exactitud y precisión	117
Tabla 12 Estimación de la repetibilidad de Hg en un nivel de control.	117
Tabla 13 Población en función del sexo.....	125
Tabla 14 Características constitucionales de los participantes en el estudio	126
Tabla 15 Media Aritmética, Mediana e Intervalo de Referencia para Hg.....	127
Tabla 16 Media Aritmética, Mediana e Intervalo de Referencia para el resto elementos traza	127
Tabla 17 Percentiles significativos, Mínimo y Máximo de la población y Límite de Cuantificación.....	129

Tabla 18 Mediana y Rango Intercuartílico RIC (percentil 25-75) de los diferentes grupos de edad por elemento	133
Tabla 19 Mediana y RIC para mostrar diferencias entre los diferentes grupos de edad (0-5 y 6-10) y (0-5 y 11-15) por elemento	137
Tabla 20 Mediana y RIC para mostrar diferencias entre los diferentes grupos de edad (0-5 y >15) y (6-10 y 11-15) por elemento	139
Tabla 21 Mediana y RIC para mostrar diferencias entre los diferentes grupos de edad (6-10 y >15) y (11-15 y >15) por elemento	141
Tabla 22 Mediana y RIC para mostrar diferencias en función del sexo por elemento.....	143
Tabla 23 Mediana y RIC que muestran diferencias en función del sexo y los diferentes grupos de edad	148
Tabla 24 Mediana y RIC que muestran diferencias en función del sexo y los diferentes grupos de edad	149
Tabla 25 Mediana y RIC que muestran diferencias en función del sexo y el grupo de edad 0-5 años.....	151
Tabla 26 Mediana y RIC que muestran diferencias en función del sexo y el grupo de edad 6-10 años	153
Tabla 27 Mediana y RIC que muestran diferencias en función del sexo y el grupo de edad 10-15 años	156
Tabla 28 Mediana y RIC que muestran diferencias en función del sexo y el grupo de edad mayores de 15 años	157
Tabla 29 Representación de las diferencias entre los grupos de 0-1 hasta 4-5 años, en función del sexo	160
Tabla 30 Representación de las diferencias entre los grupos de 5-6 hasta 10-11 años, en función del sexo.....	162
Tabla 31 Representación de las diferencias entre los grupos de 11-12 hasta mayores de 16 años, en función del sexo	163
Tabla 32 Correlaciones positivas entre elementos nutricionales	170

Tabla 33 Correlaciones positivas entre los elementos esenciales Zn, Cu y Se	171
Tabla 34 Correlaciones entre los elementos tóxicos.....	172
Tabla 35 Correlaciones entre elementos nutricionales y tóxicos.	174
Tabla 36 Análisis univariado para los grupos de edad menores y mayores de 10 años asociados a concentraciones de Pb en cabello $\geq 9 \mu\text{g/g}$	176
Tabla 37 Concentración de Hg en cabello en la población estudiada.....	177
Tabla 38 Concentración de Hg en cabello expresada como Media Aritmética, Mediana y sus Valores de Referencia.....	177
Tabla 39 Diferenciación de la concentración de Hg en función de los grupos de edad	178
Tabla 40 Diferenciación de la concentración de Hg en función del sexo	178
Tabla 41 Diferenciación de la concentración de Hg en función del sexo y los grupos de edad	179
Tabla 42 Diferenciación de la concentración de Hg en función del sexo y los grupos de edad	179
Tabla 43 Distribución del consumo de pescado en función de la edad.....	182
Tabla 44 Mercurio total en pelo ($\mu\text{g/g}$) en población infantil en función consumo pescado	185
Tabla 45 Diferencias en concentración de Hg entre los grupos de consumo de pescado (no consumidores y consumo de 1-2 veces/semana) y los grupos (no consumidores y consumo de 3-4 veces/semana)	187
Tabla 46 Diferencias en concentración de Hg entre los grupos de consumo de pescado (no consumidores y consumo mayor de 4 veces/semana) y los grupos (consumo de 1-2 veces/semana y consumo de 3-4 veces/semana).....	187
Tabla 47 Diferencias en concentración de Hg entre los grupos de consumo de pescado (consumo de 1-2 veces/semana y consumo mayor de 4 veces/semana) y los grupos (consumo de 3-4 veces/semana y consumo mayor de 4 veces/semana)	187
Tabla 48 Representación de la concentración de Hg en función del consumo de pescado y el grupo de edad.....	188

Tabla 49 Diferencia de Hg ($\mu\text{g/g}$) en pelo en distintos grupos de edad en relación al consumo de pescado	190
Tabla 50 Representación de la diferencia entre consumidores de más de 3 veces por semana y los que consumían menos de 3 veces por semana.....	191
Tabla 51 Análisis univariado para los grupos de consumo de pescado (menor de 3 veces/semana y mayor 3 veces/semana) asociados a concentraciones de Hg en cabello ≥ 1 $\mu\text{g/g}$	192
Tabla 52 Análisis univariado para los grupos de consumo de pescado (menor de 3 veces/semana y mayor 3 veces/semana) asociados a concentraciones de Hg en cabello $\geq 2,2$ $\mu\text{g/g}$	193
Tabla 53 Análisis univariado para los grupos varón y hembra asociados a concentraciones de Hg en cabello ≥ 1 $\mu\text{g/g}$	194
Tabla 54 Porcentaje de niños/adolescentes de nuestra población que exceden los límite de seguridad establecidos por la EPA y por la JECFA	195
Tabla 55 Concentración de elementos traza en pelo en diferentes estudios nacionales e internacionales.....	204
Tabla 56 Concentración de mercurio en pelo y otras muestras en diferentes estudios.....	221

Índice de figuras:

Figura 1 Representación esquemática de la Homeostasis entre elementos químicos	5
Figura 2 Comportamiento de las Hormetinas	7
Figura 3 Descenso de la concentración de plomo ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) en la atmósfera en Madrid	21
Figura 4 Enlace del mercurio a las metalotioneinas a través de los grupos sulfidrilo	51
Figura 5 Periodos de tiempo indicativos de cada tipo de muestra.....	57
Figura 6 Diagrama simplificado del folículo piloso (Harkey, 1993)	57
Figura 7 Desplazamiento de la curva de desarrollo cognitivo.....	65
Figura 8 Disminución del umbral de seguridad del Pb en sangre establecido por el CDC	67
Figura 9 Esquema de un ICP-MS. (Spectroscopy, Thomas, 2001).	84
Figura 10 Vista detallada de la antorcha (Spectroscopy).....	86
Figura 11 Diferentes zonas de temperatura en el plasma (Spectroscopy).	87
Figura 12 Vista de la zona de interfase (Spectroscopy).	89
Figura 13 Representación esquemática de la acción de un separador de masas de cuadrupolo (Spectroscopy).....	91
Figura 14 Diferente sensibilidad de un cuadrupolo que opera a 3, 1 ó 0,3 UMA de resolución (Spectroscopy).....	92
Figura 15 Eliminación de la interferencia de ArO con una célula de reacción dinámica (Spectroscopy).....	93
Figura 16 La reacción entre el NH_3 y el Ar^+ es exotérmica mientras que no se produce reacción entre NH_3 y el Ca^+ (Spectroscopy).	95
Figura 17 Población categorizada en 5 grupos de edad	124
Figura 18 Categorías de edad de la población en función del sexo	125

Figura 19 Diagrama de cajas variación concentración de Zn con la edad.....	135
Figura 20 Diagrama de cajas variación concentración de Mn con la edad.....	135
Figura 21 Diagrama de cajas variación concentración de Ba con la edad	136
Figura 22 Diagrama de cajas variación concentración de Pb con la edad.....	136
Figura 23 Diagrama de cajas variación concentración de Ag con la edad.....	137
Figura 24 Diagrama de cajas variación concentración de Tl en función del sexo.....	145
Figura 25 Diagrama de cajas variación concentración de Ag en función del sexo	146
Figura 26 Diagrama de cajas variación concentración de Cu en función del sexo	147
Figura 27 Diagrama de cajas variación concentración de Sr en función del sexo.....	147
Figura 28 Diagrama de cajas mostrando variación concentración de Al en función de la edad y el sexo.....	153
Figura 29 Diagrama de cajas variación concentración de Tl en función de edad y sexo	155
Figura 30 Diagrama de cajas mostrando variación concentración de Cu en función de la edad y el sexo.....	159
Figura 31 Correlación entre las variables Zn y edad.....	166
Figura 32 Correlación entre las variables Pb y edad.....	167
Figura 33 Correlación entre las variables As y frecuencia de consumo de pescado	168
Figura 34 Correlación entre las variables Zn e IMC.....	169
Figura 35 Correlación entre las variables Cromo y Hierro	170
Figura 36 Correlaciones entre los elementos tóxicos Cd y Pb.....	172
Figura 37 Correlación entre los elementos tóxicos Cd y Mn	173
Figura 38 Correlación inversa entre Pb y Zn.....	175
Figura 39 Correlación entre las variables Hg y edad.	179

Figura 40 Correlación entre las variables Mercurio y Hierro.....	181
Figura 41 Correlación entre las variables Mercurio y Cromo.....	181
Figura 42 Frecuencia de distribución del consumo de pescado en función de la edad	183
Figura 43 Correlación entre las variables Mercurio y consumo de pescado.....	184
Figura 44 Diagrama de cajas que representa la diferencia de concentración de Hg en pelo en función del consumo de pescado	186
Figura 45 Diagrama de cajas que muestra las diferencias en los distintos grupos de edad en función del consumo de pescado	189
Figura 46 Distribución del consumo per cápita mundial de pescado 2007.....	212
Figura 47 Diferencias en el consumo de productos del mar por comunidades autónomas (Desviación, en kilos, con la media nacional)	215

Introducción

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Todos los tejidos animales y los alimentos contienen elementos minerales o inorgánicos en cantidades y proporciones muy variables. Pese a ello, hasta el siglo XIX sólo se tenían algunas ideas confusas sobre la naturaleza, el origen y las funciones de los componentes minerales de la materia viva.

El primer experimento conocido que demostró claramente la importancia nutritiva de los minerales lo realizó en Inglaterra Fordyce en 1791, quien puso de manifiesto que la alimentación de canarios con una dieta de semillas, como único alimento, requería un suplemento de “tierra calcárea” para mantenerlos sanos y producir huevos.⁵⁶

Desde la época de Berzelius, los elementos minerales se clasifican en metales y metaloides (actualmente, no metales). Dicha clasificación, aparte de las diferencias de orden físico o mecánico, se basa en las distintas propiedades químicas que presentan. En solución, al hacer pasar una corriente eléctrica, los metales migran hacia el cátodo (electropositivo, cationes) mientras que los no metales migran hacia el ánodo (electronegativos, aniones).

Los elementos no metales representan el 98.1% del peso del organismo humano (H, C, N, O, P, S...), mientras que los metales participan con unos porcentajes que no van más allá del 1.9%, lo que equivale aproximadamente a 1.33 Kg del peso corporal. En suma, “todo el conjunto de los metales del organismo no pesa más de un kilo y medio.” (Harper, 1978).

A su vez, los minerales, de acuerdo con su participación en el organismo, también se agrupan en dos categorías con múltiples denominaciones:

- Minerales micronutrientes: elementos mayoritarios, macroelementos o electrolitos.
- Minerales micronutrientes: elementos minoritarios, oligoelementos o elementos traza.

Cuando hablamos de Minerales micronutrientes o elementos traza, término acuñado a finales del siglo XIX, hacemos referencia a aquellos elementos encontrados en el organismo en concentraciones por debajo del límite de detección analítico en cada momento. El término persiste hoy día a pesar de las modernas técnicas analíticas que permiten la determinación de la mayoría de los elementos traza e incluso ultratrazas.

Así, la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC)¹⁴⁰ define como elemento traza a aquél cuyo contenido en suero o plasma es inferior a 100 mg/L o 100 partes por millón (ppm), con ello, es aceptada ampliamente la costumbre de utilizar la concentración sérica de hierro como límite de separación entre elementos mayoritarios y elementos traza²⁵⁹

Actualmente, se ha ampliado el número de elementos traza y se ha establecido una diferenciación en función de su abundancia en el organismo. Así, han sido clasificados en 2 grupos:

- Elementos traza: aquellos cuya concentración está en rango de partes por millón (ppm) o $\mu\text{g/mL}$ (Ej. Fe, Zn, Cu...)
- Elementos ultratrazas: aquellos presentes en el organismo en un rango de partes por billón (ppb) o $\mu\text{g/L}$ ²⁵⁹ o bien, aquellos cuya concentración sea inferior a 10 ng/g o 10 $\mu\text{g/L}$ ^{264,18}(Ej. Al, Ni, Cr, Mo...). Aunque algunos autores los definen como aquellos cuyos requerimientos dietéticos son menores de 1 $\mu\text{g/g}$.²⁵⁹

Gabriel Bertrand, considerado el padre de la investigación de los elementos traza y acuñador, a principios de siglo, del término oligoelemento (del griego “*oligos*” *escaso*), no solo señaló la escasa cantidad y participación de los mismos en el organismo, sino que intuyó el papel *esencial* que desempeñarían éstos en los seres vivos.

La expresión esencialidad ha servido para dar paso a nuevas precisiones en la clasificación de los elementos que forman parte de los seres vivos, contando no sólo el aspecto cuantitativo, sino el cualitativo de su necesidad. El término *esencial*, tomado de la bioquímica de los aminoácidos y las proteínas, es utilizado para clasificar a los elementos traza. Así, Underwood³⁰⁴ diferencia a los Elementos traza, de acuerdo con los requerimientos

dietéticos de los animales superiores, en tres grupos: esenciales, posiblemente esenciales y no esenciales.

En la misma línea, Schroeder²⁵⁹ considera que los elementos traza pueden dividirse en dos grupos, los que participan en reacciones bioquímicas necesarias (*Elementos traza esenciales*) y los que no lo hacen (*Elementos traza no esenciales*). Siendo, asimismo, estos últimos divididos en los no perjudiciales para la materia viva en las concentraciones habituales en las que se encuentran en el medio ambiente (*Elementos traza no tóxicos*) y aquellos que lo son (*Elementos traza tóxicos*).

1. *Elementos traza esenciales*
2. *Elementos traza no esenciales*
 - *Elementos traza no tóxicos*
 - *Elementos traza tóxicos*

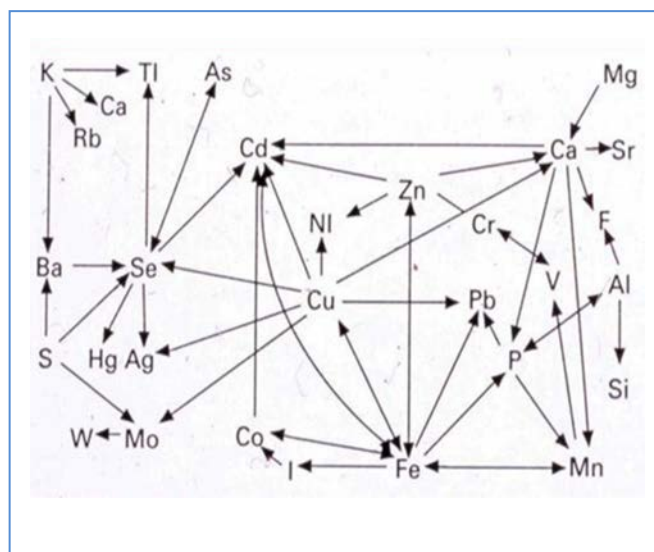
Hasta 1957 solo se consideraban esenciales para los animales y el hombre siete elementos: hierro, iodo, cobre, manganeso, cinc, cobalto y molibdeno. En este mismo año se incorporaron el selenio y el cromo. Posteriormente, se encontró que resultaban necesarios el estaño y el vanadio para el crecimiento de las ratas y el flúor para el desarrollo de sus huesos y dientes. Sucesivamente, en las últimas décadas se han ido incorporado algunos más.

Por otra parte, hay que recordar que también la mayoría de los oligoelementos considerados imprescindibles para el correcto funcionamiento del organismo en concentraciones traza son metálicos: Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Se, Cr, Sn, Va, Mo...

Estos metales esenciales, aunque se encuentren en pequeñísimas proporciones en los seres vivos, han demostrado ser imprescindibles para el organismo humano, dado que participan de forma decisiva en distintos procesos. En algunos casos, como en el Fe o el Cu actúan en reacciones redox como intercambiadores de electrones para la formación de metaloproteínas (Hemoglobina, citocromos...) ²⁴⁸. En otros, intervienen en la formación de metaloenzimas en las que actúan como coenzimas.

Por otro lado, y aunque como ya se ha dicho los metales esenciales son necesarios para los procesos biológicos, intervienen siempre a muy bajas concentraciones, puesto que a mayores proporciones podrían actuar como tóxicos. De hecho, en condiciones fisiológicas, los elementos inorgánicos mantienen en los organismos vivos un equilibrio o interacción conocida como *Homeostasis*, que se descompensa cuando se produce un aumento o una disminución de cualquiera de ellos. (Martin, 1988).

Figura 1 Representación esquemática de la Homeostasis entre elementos químicos



También y frente al grupo de esenciales, de entre los aproximadamente 80 elementos químicos que son considerados metales, alrededor de 30 son considerados tóxicos para el hombre. Así de acuerdo con la ATSDR, Agency for Toxic substances and Disease Registry, 2007 (EEUU), entre la lista de sustancias peligrosas que pueden tener mayor incidencia sobre la salud, se encuentran en los tres primeros puestos Arsénico, Plomo y Mercurio y en la 6ª posición el Cadmio^{8,20}.

Tabla 1 Listado de sustancias peligrosas establecido por la ATSDR

Top 10 Dangers, CERCLA Priority List of Hazardous Substances for 2007

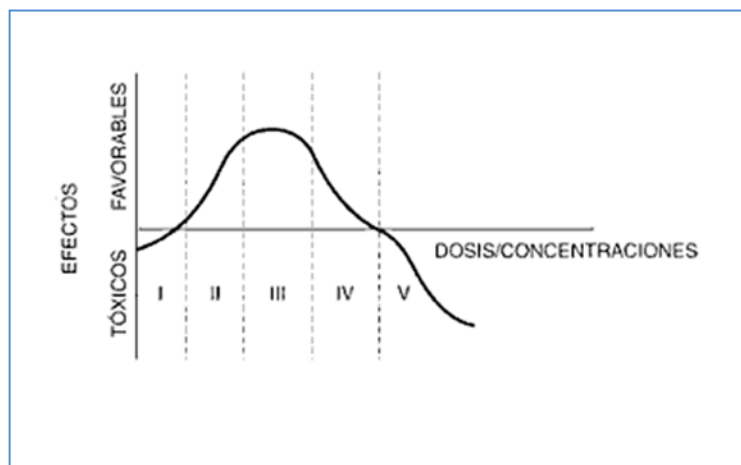
Rank	Substance
------	-----------

1	Arsenic
2	Lead
3	Mercury
4	Vinyl chloride
5	Polychlorinated biphenyls (PCBs)
6	Benzene
7	Cadmium
8	Polycyclic aromatic hydrocarbons
9	Benzo(A)pyrene
10	Benzo(B)fluoranthene

En suma, los efectos de cualquier elemento traza van desde la deficiencia hasta la toxicidad, pues como ya señalara Paracelso hace más de cuatro siglos, sus efectos están íntimamente unidos al de dosis, *“el efecto depende de la dosis”*, *“dosis sola facit venenum”*, de modo que prácticamente todos los compuestos pueden ser tóxicos a una dosis determinada e inoocuos a otra.

Los elementos que presentan ese tipo de comportamiento son los considerados hormetinas, según la denominación establecida por LucKey y Venugopal en 1977 para identificar a aquellos elementos cuyas dosis o concentraciones orgánicas se correlacionan con unos efectos bien tóxicos o beneficiosos.

Figura 2 Comportamiento de las Hormetinas



Más recientemente, Underwood en la década de los 80³⁰⁴, precisaba lo que ya decía Paracelso, estableciendo que cada elemento exhibe un espectro de acciones que depende de la dosis y el estado nutricional del organismo que lo recibe. Conforme se incrementan las cantidades administradas de elemento se provocan aumentos de las respuestas biológicas hasta que se alcanza una meseta cuya anchura viene determinada por la capacidad homeostática. Los ingresos que exceden esta cantidad pueden producir acciones farmacológicas, que conducen a efectos tóxicos si se continúan administrando cantidades mayores del elemento¹³³. Paradigma de lo anterior es el selenio, que fue considerado durante mucho tiempo elemento tóxico, pasando finalmente a formar parte del grupo de elementos esenciales

Introducida la importancia de estos elementos en y para el funcionamiento de nuestro organismo, la modificación de su influencia sobre éste en función de su concentración, así como los órdenes de magnitud de ésta en que se encuentran, no se hace difícil justificar la importancia de ser capaces de establecer con la máxima fiabilidad posible sus valores de referencia en los diversos fluidos y muestras biológicas objeto de análisis.

A su vez, es obvio que la necesidad de la determinación con precisión y exactitud de los valores de referencia de estos parámetros cobrará aún mayor importancia en las fases iniciales del desarrollo humano, fetos, bebés y niños, pues la influencia de las posibles variaciones en la concentración presente de estos elementos en sus organismos, tendrán, aunque solo fuera por las evidentes diferencias de peso, talla y volumen con los adultos, mayor impacto. Impacto que pudiera verse incrementado aún en mayor medida por la interacción de diversos factores derivados de la fase de crecimiento y desarrollo en que se encuentran¹⁴¹.

Un elemento cada vez más citado y tenido en cuenta como posible causa origen de esas variaciones de la concentración de estos elementos traza en los seres vivos, es la contaminación ambiental, a la que, como otra vez es obvio, resultan mucho más vulnerable o susceptibles los fetos, bebés y niños²⁹.

El innegable y hasta la fecha imparable aumento de la contaminación ambiental de nuestro planeta, de sus mares, tierras emergidas y atmósfera, es objeto cada día de mayor preocupación entre la sociedad en general y la comunidad científica en particular, entre otras, por la influencias que se empiezan a evidenciar en la salud de los seres humanos.

En este sentido, diversos estudios apuntan a una posible relación entre el aumento que se viene detectando, en los países occidentales, del número de niños afectados por alteraciones del neurodesarrollo en las últimas décadas con la contaminación medioambiental⁶³.

Parte de esa contaminación medioambiental se constata por el aumento de la concentración de los antes citados elementos minerales tanto en los mares que nos proveen de alimento, como en la atmósfera que nos rodea y respiramos; lo que parece vaticinar la posibilidad que de una forma u otra esa contaminación, pudiera alterar los índices de presencia de esos elementos traza en nuestro organismo y afectar a nuestra salud.⁶⁸

Uno de los vectores de transmisión de esa contaminación claramente identificado hasta la fecha, es la incorporación a nuestro organismo de cantidades significativas de mercurio a través de la ingesta de los grandes predadores marinos, que, debido a su longevidad y voracidad, la han ido acumulando a lo largo del tiempo en sus organismos en cantidades mucho mayores a las inicialmente esperadas.^{6,7,74,277,327,328}

Es conocido que nuestro país, esta en el grupo de cabeza en lo que se refiere a los datos de consumo de pescado por persona y año^{93,178, 189}; pero no se dispone, hasta la fecha, de los adecuados y necesarios estudios que evidencien una variación en los valores de referencia de la concentración de estos elementos antes citados, principalmente mercurio, en la población española y especialmente en los grupos identificados como más vulnerables a las posibles alteraciones de los mismos^{232,233}.

Alteraciones que para su identificación y cuantificación, se hace necesario ser capaces de establecer y, por tanto, de disponer de valores de referencia de elementos traza en la población humana en general, y en lo niños en particular.

Fruto de estas reflexiones, surgió la idea de realizar este trabajo de investigación, a fin de tratar de avanzar en el establecimiento de los valores de referencia de esos parámetros en niños, a la vez que analizar la posible influencia que esa diferencia tan marcada en el consumo de pescado en España respecto a otros países, pudiera tener en los indicadores de ese grupo de población.

Es en esa aproximación inicial al problema, una vez centrado éste en ese grupo de población infantil antes citado, el momento en que se valora identificar las variaciones de estos elementos en las muestras de cabello^{238,251}, dado que a través de ellas se puede efectuar un análisis de una forma muy poco o nada invasiva o agresiva para el sujeto a analizar.

Las características antes citadas, unidas a otras ventajas de la muestra de pelo, como la facilidad de su obtención y de su conservación, su estabilidad, la posibilidad de observar la variación de elementos a lo largo del tiempo, el establecimiento o determinación del estado nutricional del sujeto, etc, hicieron centrar definitivamente en esta matriz los objetivos de la investigación^{101,150,155}.

Es claro y evidente, también para mí, que aun llevando a buen puerto este trabajo y consiguiendo los objetivos que antes anticipaba, no habré solucionado, en modo prácticamente alguno, los graves problema que antes identificaba, pero si espero al menos haber contribuido, aunque sea de forma modesta al inicio de su resolución, pues soy consciente que, como decía WEBER, "...toda obra científica terminada no tiene otro sentido que el de plantear nuevas cuestiones: demanda ser rebasada y tiene que envejecer".

1.2 Elementos traza

Como se ha visto anteriormente, la mayoría de los elementos químicos son metales, con propiedades ópticas, eléctricas y mecánicas características que, reciben el nombre de propiedades metálicas. A temperatura ambiente, excepto el mercurio, son sólidos cristalinos opacos, con brillo característico (brillo metálico), buenos conductores del calor y la electricidad, así como, dúctiles y maleables. En ellos, las propiedades más características son las magnéticas, junto con conductividad eléctrica. Pese a la presencia de propiedades metálicas comunes, manifiestan asimismo, notables diferencias en sus propiedades químicas. Así, por ejemplo, difieren en sus estados de oxidación, en la preferencia por un determinado tipo de ligando, o en la forma de disponerse estos ligandos en torno al metal en sus complejos.

Por otro lado, la IUPAC en un informe reciente (2002 Toxic.News. Duffus JH) establecía que la expresión *Metales Pesados* era utilizada de forma incorrecta, dado que los auténticos metales pesados eran aquellos cuyo peso atómico o masa atómica estaba comprendida entre el del Cobre (Pa: 63,55) y el del Mercurio (Pa: 200,59). De ello, se deduce que no todos los elementos químicos tóxicos son metales pesados, ya que como se observa seguidamente en la tabla 3, numerosos elementos que pueden ser tóxicos son menos pesados que el Cobre.

Tabla 2 Metales de menor peso atómico que el Cu

Metales de menor p.a. que el cobre	
Elementos	Pesos atómicos
Be	10
Al	27

P	31
Mn	55
Fe	55,8
Ni	58
Cr	59

Se consideran a continuación aspectos del metabolismo de aquellos elementos traza metálicos que son esenciales y, posteriormente se tratarán los aspectos toxicológicos comunes

1.3 Metabolismo elementos traza

La palabra metabolismo procede de la raíz griega “*metábolē*” que significa cambio. Por tanto, hace referencia al conjunto de cambios que experimenta un compuesto desde su entrada en el organismo hasta su eliminación. Frieden (1978) fue uno de los primeros en establecer las etapas esenciales del metabolismo de un micronutriente que son expuestas a continuación¹⁹⁵:

Aprovechamiento dietético

Absorción intestinal

Transporte al lugar de almacenamiento

Almacenamiento en los tejidos específicos

Movilización y transporte a los tejidos diana

Utilización para la síntesis de metaloproteínas

Papel esencial en las metaloenzimas

Catabolismo de las metaloproteínas

Reciclaje, junto con transporte y reutilización

Eliminación

Desde el punto de vista del metabolismo podemos dividir a los elementos traza en tres grupos:

1. Elementos catiónicos: Zinc, Hierro, Cobre, Manganeseo.

Se absorben con una eficacia variable y su control homeostático esta mediado por el hígado y el tracto gastrointestinal.

2. Elementos aniónicos: Cromo, Selenio, Molibdeno.

Se absorben eficazmente por el intestino y se excretan de forma predominante por el riñón.

3. Elementos que existen como complejos orgánicos que afectan su metabolismo:

Selenio formando selenominoácidos.^{226,235}

Cobalto interviniendo en la Cianocobalamina.

Cromo, cofactor de la Insulina. Factor de tolerancia a la glucosa²⁹⁷.

Hierro interviene en el grupo Hemo²⁴⁸

El control metabólico de todos estos grupos se ejerce en función de los estados de oxidación de los elementos y de su interacción con los posibles ligandos.

1.3.1 Absorción

La absorción de los elementos que se presentan en los alimentos en forma de pequeños aniones o que son convertidos en pequeños aniones en el tracto digestivo es mayor que la de las formas catiónicas y, frecuentemente, casi completa. Tales formas aniónicas, están normalmente menos sujetas a interacciones dietéticas y control homeostático a nivel de la absorción intestinal; mientras que, por el contrario, las formas catiónicas están sujetas a mecanismos estrictos de regulación, en algunos casos a través de un control hormonal y en otros a nivel absorción y/o excreción. Este último grupo lo integran metales alcalinos, alcalinotérreos y gran parte de los elementos de transición.²³⁶

El estado químico de los elementos catiónicos es otro factor a tener en cuenta a nivel de su absorción. Así, por ejemplo, en la deficiencia severa de hierro, el organismo no puede incrementar la eficiencia de la absorción lo suficiente como para satisfacer sus requerimientos si el hierro procedente de la dieta no se encuentra en la forma química adecuada. Por otro lado, el ácido ascórbico incrementa la absorción de hierro y sin embargo reduce la del cobre. De todo ello se deduce que la biodisponibilidad de estos elementos depende tanto de la forma química de presentación en los alimentos, como de las interacciones con otros componentes de la alimentación que puedan desplazar los ligandos originales.^{48,60,239}

Otros hechos a tener en cuenta podrían ser:

La hidrólisis de lípidos y proteínas en el medio ácido del estómago que permite la disociación de los metales en este medio.

La influencia de ligandos antagonistas, como fosfatos orgánicos e inorgánicos que limitan su biodisponibilidad. El ortofosfato y los polifosfatos tienen una interacción sinérgica con el calcio y el magnesio y forman sales insolubles con el cinc, hierro y cobre al pH intestinal. De esta forma actúa el fitato, compuesto de almacenamiento de fósforo que se encuentra en los cereales, algunas legumbres, nueces, frutos, tubérculos y raíces. En gran medida es atribuida a éste la disminución de la disponibilidad de elementos traza en los vegetales.^{48,266}

A su vez, se ha estudiado la competición que puede existir entre diferentes elementos metálicos por la unión de ligandos endógenos (Fe- Zn, Cu-Zn, Fe- Mn...)²³⁶

Además, la mayoría de estos elementos tienen en común la afinidad por la metalotioneína^{15,110}. Proteína con alto contenido en cisteína y por ello, con alta afinidad por algunos cationes metálicos tales como: cobre, zinc, plata, cadmio, mercurio¹⁴⁷

Por otro lado, el principal lugar de absorción de estos elementos traza es el intestino delgado proximal. Son tres los procesos a tener en cuenta en dicha absorción intestinal: el paso a través del ribete en cepillo, la transferencia a través del enterocito y la liberación en la porción lateral y/o basal de la célula intestinal.

Una vez absorbidos todos los elementos traza, tanto aniónicos como catiónicos, deben experimentar alguna transformación química antes de que puedan ejercer sus efectos biológicos. Esto implica cambios en su esfera de coordinación o en el estado de oxidación, pero en todos los casos resulta una unión específica para el transporte de sustancias que dirigen los elementos hacia sus órganos o tejidos diana.

Asimismo, a nivel del tracto gastrointestinal se puede producir interacción entre dichos elementos por la competencia suscitada en los lugares de unión a proteínas, afectándose de esta forma su absorción. Así, la velocidad de absorción de cadmio está aumentada cuando existe deficiencia de ciertos elementos con un mecanismo de transporte común¹⁴². Los

suplementos de Zn que superan en 10 veces a los ingresos diarios recomendados (15 a 20 mg/día) producen un déficit condicionado de cobre acompañado de anemia¹¹⁰, o las dietas pobres en selenio o zinc pueden dar lugar a una mayor absorción de plomo ^{110,235}

La homeostasis aplicada a estos elementos podría interpretarse como la tendencia a mantener las concentraciones adecuadas en un orden jerárquico. Primero, en los lugares de acción mas importantes fisiológicamente hablando, después, en aquellos lugares menos importantes para la inmediata supervivencia y, finalmente, en los depósitos de reserva. Así, de esta manera, las concentraciones en las estructuras vitalmente importantes son mantenidas constantes, incluso en las deficiencias moderadas cuando otros lugares menos vitales presentan carencias.

Esta homeostasis mantiene su eficacia cuando se ha agotado la capacidad reguladora de los mecanismos de absorción y excreción

1.3.2 Transporte plasmático

Aunque mayoritariamente estos elementos son trasportados unidos a proteínas, se pueden observar en las siguientes fracciones:

- Unidos a proteínas
- Unidos a aminoácidos y pequeños complejos
- Libres o iónicos

1.3.3 Distribución y excreción

La distribución tisular e intracelular de los elementos traza no es uniforme, lo que refleja la enorme diversidad funcional de los mismos.

El hierro, por ejemplo, se concentra fundamentalmente en el hígado, bazo y la médula ósea. Por otro lado, el zinc^{42,110} alcanza una concentración en el coroides y en la retina tres veces más elevada que en los leucocitos, que a su vez llega a ser diez veces mayor que en los eritrocitos.

Es sin duda el hierro el elemento traza mayoritario dado que representa más de la mitad del contenido total de éstos. Junto con el zinc, representan tres cuartas partes del total de los mismos.

Al igual que ocurre en la distribución, no existe un patrón específico que regule su excreción. De hecho, se pueden ver patrones de excreción intestinal, urinario...

1.3.4 Requerimientos dietéticos y nutrición

Aunque en los alimentos se pueden encontrar un sinfín de componentes, el número de nutrientes esenciales no suele ser muy numeroso, entre ellos cabe destacar algunos ácidos grasos insaturados, aminoácidos, minerales, vitaminas, agua y unos pocos elementos traza

Por ser considerados algunos de estos elementos traza esenciales para el organismo y, siguiendo las directrices establecidas por el National Research Council *NRC* de USA, han sido establecidas unas cantidades necesarias de dichos nutrientes, los denominados *Aportes Dietéticos Recomendados (RDA)* que, resultan adecuados para satisfacer las necesidades nutricionales de la práctica totalidad de las personas sanas¹⁹⁵

Por otro lado y teniendo en cuenta los efectos tóxicos que pueden originar se han creado unos límites de ingesta máximos, establecidos por distintas entidades como la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) de EEUU^{80,86}

En la siguiente tabla se muestran a modo de ejemplo niveles guías saludables de diferentes elementos comparándolos con datos de su ingesta

Tabla 3 Comparación de las ingestas diarias estimadas de cada elemento para cada grupo de población con los valores saludables de las guías correspondientes ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ peso corporal/día.)

Elemento	Adultos	Niños pre-escolares (1,5-4,5 años)	Jóvenes (4-18 años)	Ancianos	Guías de Valores Saludables
Aluminio	71	187	123	59	JECFA PTWI: 143 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ peso corporal/día
Arsénico (Total)	1,7	6,7-2,8	1,9-2,0	1,7-1,8	COT: no existen valores guía saludables (Total)
Arsénico (Inorgánico)	0,028-0,093	0,075-0,246	0,055-0,158	0,024-0,079	JECFA PTWI: 2,1 pg/Kg peso corporal/día COT: la exposición debe ser revisada
Níquel	1,5-1,6	4,2-4,9	2,6-3,1	1,3-15	EVM: nivel guía 4,3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ peso corporal/día OMS: TID 12 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ peso corporal/día
Silicio	ND	ND	ND	ND	EVM: 760 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ peso corporal/día

ND: no disponible; JECFA: Comité de Expertos de la Junta FAO/OMS

PIWI: Ingestas Semanales Tolerable Provisionales; TDI: Ingestas Diarias Tolerables

EVM: Grupo de Expertos en Vitaminas y Minerales

1.4 Toxicología de los elementos traza

La potencial toxicidad de los elementos metálicos se conoce desde tiempos remotos. De hecho, ya Hipócrates 370 a. C, lo acreditaba con la descripción de un cólico abdominal en un hombre presuntamente intoxicado con metales. Referencias similares realizó Teofrasto de Eresus (372-287 a.C.) en relación con el arsénico y el mercurio, que por otra parte representaban los venenos más conocidos por el hombre de la época.

Los elementos metálicos dan lugar a diferentes tipos de compuestos:

- Metales en estado elemental.
- Compuestos inorgánicos: halogenuros, hidroxilos, oxoácidos.
- Compuestos orgánicos: alquilos, acetatos, fenilos.

Los metales en forma inorgánica son los componentes fundamentales de los minerales de la corteza terrestre por lo que se cuentan entre los agentes químicos tóxicos de origen natural más antiguamente conocidos por el hombre.

1.4.1 Fuentes de exposición

En la actualidad, la exposición a elementos metálicos se produce de forma específica en la actividad laboral, como ha sucedido a lo largo de la historia, pero además la población

general puede entrar en contacto con ellos a través del agua, los alimentos y el medioambiente, donde su presencia se ha incrementado por la intervención de la actividad industrial humana sobre los ciclos hidrogeológicos^{195,239,269}.

Un gran número de actividades industriales implican la manipulación de metales. Entre ellas hay que destacar la minería, las industrias de transformación, incineradoras, fundiciones y metalurgia en general ^{22,191}. Actividades específicas producen riesgos mayores frente a determinados elementos, como la exposición al plomo en las empresas de baterías o exposición al mercurio en las operaciones de electrólisis ^{47,279}. Otro hecho que ha recibido una notable atención en las últimas décadas ha sido potencial exposición al estaño, mercurio y plata de los trabajadores dentales. ^{77, 276}.

Además, elementos metálicos aparecen en el agua y en los alimentos ^{86,195,239}. Esta presencia es imprescindible en el caso de muchos de ellos, mencionados anteriormente cuando hablábamos de los metales esenciales, pero resulta tóxica cuando la concentración excede determinados límites o cuando se trata de alguno de los elementos potencialmente peligrosos. Clásicamente, por ejemplo, ha sido conocida en España la presencia de plomo en exceso en el agua de consumo procedente de las tuberías de viviendas construidas antes de 1975 ^{177,260}. Por esta razón, el Real Decreto de aguas de consumo 140/2003 establece que el contenido máximo de plomo en el agua, fijado en 50 µg/L hasta el 31 de diciembre de 2003, se debe rebajar a 25 µg/L hasta diciembre de 2013 y que a partir del 1 de enero de 2014 no deberá superar los 10 µg/L.

El agua que es ácida o blanda, y especialmente si está caliente, puede liberar gran cantidad de plomo de las tuberías, principalmente en aquellas en las que el agua permanece estancada largo tiempo. En contraste, el agua dura contiene cationes carbonato (CO_3) que, junto con el oxígeno, forman una capa insoluble de PbCO_3 en la superficie de la tubería, lo que evita que el metal se disuelva en el agua cuando ésta pasa a través de la tubería.

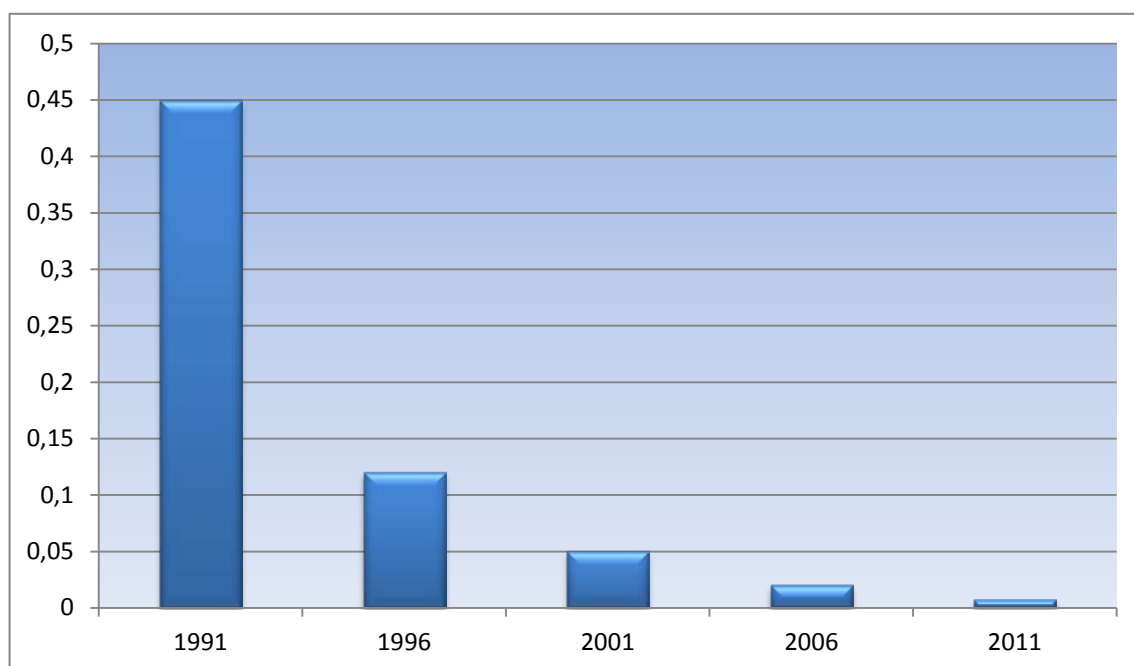
Asimismo, algunas de las epidemias tóxicas alimentarias más graves han implicado elementos metálicos, éste fue el caso de la intoxicación masiva que se produjo por el consumo de pescado contaminado por mercurio en la bahía de Minamata (Japón) a finales de los años 50^{122,153}. Una empresa química vertía directamente en el agua de la bahía el mercurio que empleaba como catalizador para la producción industrial de acetaldehído. Entre 1953 y

1960 murieron 78 personas y se produjeron multitud de afectados. Otro incidente en relación con el mercurio, ocurrió en el otoño de 1971, cuando Irak importó gran cantidad de semillas de cebada y trigo tratadas con un fungicida a base de metilmercurio y las distribuyó para su siembra en la primavera de 1972. A pesar de las advertencias oficiales, el grano fue molido y la harina se usó para hacer pan. Como resultado, más de 6.500 personas fueron hospitalizadas y 500 fallecieron^{11,12}.

Por otro lado, la fuente de exposición alimentaria sigue manteniendo su importancia como se ha demostrado en las últimas dos décadas en numerosos países (Camboya, Chile, China, Estados Unidos, India...), tras las epidemias de arsenicosis por consumo de agua de bebida con As.^{10,38,318,337}

Por último, no se debe olvidar como fuente de exposición en la población general la contaminación ambiental gracias a la contribución de diversos metales tales como plomo, manganeso... que se encuentran en el aire ambiental en forma de polvo, humos o aerosoles de partículas que pueden depositarse en el tracto respiratorio al inhalarse. Con frecuencia por un origen industrial, en otros casos procedentes de las emisiones antropogénicas como las combustiones fósiles y finalmente tras la utilización en aditivos antidetonantes de combustibles como el Tetraetilplomo o el Metilciclopentadienilo-Manganeso-Tricarbonilo (MMT- Mn), sujetos ambos a diferentes regulaciones.^{37,148,254}

Seguidamente, puede observarse como ha ido disminuyendo drásticamente la concentración de plomo en la atmósfera de una gran ciudad como Madrid al limitarse la utilización del plomo en las gasolinas.

Figura 3 Descenso de la concentración de plomo ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) en la atmósfera en Madrid

1.4.2 Factores toxicocinéticos

La edad, la dieta y las interacciones y exposiciones simultáneas a otros metales son factores exógenos que pueden modificar la toxicidad de los metales.^{1,195,216,219}

Por grupos de edad, son los niños y los ancianos los más susceptibles a los efectos tóxicos³⁰. En el caso de los niños, éstos absorben mejor los metales a nivel gastrointestinal que los adultos. Así, en el caso del plomo se ha estimado que en los niños la absorción es aproximadamente del 40-50% del plomo ingerido, mientras que en adultos el porcentaje de absorción oscila entre un 3-10%.³⁰¹ Esta diferencia puede deberse a la mayor densidad de transportadores de proteínas a nivel intestinal durante los períodos de crecimiento.^{72,73}

En relación a la dieta, la toxicidad de los metales varía en función de su absorción a través del tracto gastrointestinal que depende del status de micronutrientes en el lumen intestinal.^{208,216} Se ha demostrado una relación inversamente proporcional entre el contenido

proteico de la dieta y la toxicidad del cadmio y el plomo⁸⁶. A su vez, la vitamina C reduce la absorción de estos dos metales probablemente por que aumenta la absorción del ión ferroso. Por otro lado, la deficiencia de hierro durante períodos de rápido crecimiento como en la infancia también aumenta la absorción gastrointestinal de plomo²⁴⁸.

En relación con la simultaneidad de otros metales, la deficiencia de calcio aumenta la absorción intestinal de plomo dado que ambos compiten por sitios de unión similares en las proteínas de la mucosa intestinal¹⁸⁷. El zinc parece tener cierta influencia sobre la absorción del plomo ya que varios estudios han mostrado que a medida que el contenido en zinc de la dieta aumenta, la absorción de plomo y su consiguiente toxicidad disminuyen ^{42,110}

Por último, la presencia de alimentos en el tracto gastrointestinal puede modificar la absorción de metales. De esta manera, se ha visto que la absorción de plomo en adultos puede aumentar hasta un 63% si éste es ingerido en situación de ayuno. En niños este aumento puede ser incluso mayor e incluso en períodos de ayuno más cortos, ya que tienen un vaciamiento gástrico más rápido que los adultos, por lo que es importante que los niños no espacien mucho las comidas.³⁰¹

Las características y efectividad del transporte de membrana condicionan la expresión de la toxicidad de las sustancias químicas al determinar su tiempo de permanencia junto a sus dianas. Estas características dependen de diversos factores entre los que destaca la hidro o liposolubilidad, volatilidad, masa molecular y la existencia de mecanismos específicos de transporte.

En el caso de los elementos metálicos las características mencionadas pueden diferir mucho entre distintos compuestos del mismo elemento. Las moléculas inorgánicas tienden a ser más hidrosolubles que las orgánicas aunque algunas sales como son las de plomo (sulfato, carbonato, cromato, fosfato y sulfuro de plomo) son totalmente insolubles. Tampoco todas las moléculas orgánicas presentan la misma liposolubilidad como se verifica en el caso de los compuestos organomercuriales.^{51,57,171,280}

En relación con la absorción y la distribución, los compuestos organometálicos se benefician de una mejor difusión, por lo que se absorben, bien por vía digestiva, bien por vía cutánea. La vía respiratoria es importante, por un lado, en caso del mercurio, que es el único

metal volátil, y por otro, en la exposición a humos y vapores metálicos en condiciones extremas de temperatura^{280,281}. Asimismo, esta vía es importante medio de introducción de partículas, conteniendo elementos metálicos, hacia los macrófagos alveolares como ocurre en el caso del plomo. Las sales metálicas inorgánicas se absorben y difunden con mayor dificultad y algún compuesto, como el mercurio metal, no se absorbe por vía digestiva salvo a dosis muy altas.

El modelo farmacocinético de los compuestos metálicos afecta en general muy poco a su toxicidad. Los compuestos orgánicos tienden a transformarse en inorgánicos lentamente aunque en algún caso, como el As, sucede lo contrario.^{38,318}

La vida media de los compuestos metálicos en el organismo es variable. Tiende a ser prolongada en el caso del Pb y el Cd, con vidas medias superiores a los 20 años, debido a su afinidad y acumulación en el hueso. Así, en el caso de Pb casi un 90% se almacena en el hueso. Por el contrario, otros elementos como el As o el Cr no se acumulan y tienen vidas medias muy cortas, aunque pueden detectarse durante un tiempo más prolongado en lugares considerados de eliminación como son el pelo y las uñas.

Estos compuestos sufren escasa biotransformación y por tanto muy poca biodegradación. Este hecho, junto con la lentitud en la excreción, conduce a fenómenos de bioacumulación.

Como se ha visto en la homeostasis, la interacción mutua conlleva la sustitución de unos elementos por otros, especialmente en el caso de algunas parejas de elementos (por ej. Potasio por Litio, Calcio por Plomo o por Estroncio...) ^{158, 159} lo que desencadena importantes repercusiones fisiológicas y toxicológicas.

La sangre, orina y pelo son las muestras biológicas más empleadas para medir una exposición o dosis. Las dos primeras para determinar una exposición reciente y la última para determinar una exposición anterior y su evolución en el tiempo.³¹³

Más adelante introduciremos el pelo que ha sido la matriz elegida en la valoración de los elementos traza.

1.4.3 Mecanismo de acción tóxica

La toxicidad de los compuestos metálicos se diferencia de la mayoría de las moléculas orgánicas por el hecho de depender de manera muy característica del elemento metálico en cuestión, aunque, como se ha indicado, la expresión de esa toxicidad depende también de las modificaciones toxicocinéticas derivadas del tipo de molécula. Así, por ejemplo, el mercurio orgánico es principalmente neurotóxico por su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, mientras que el cloruro mercúrico es nefrotóxico al eliminarse por el riñón.

Como ya mencionamos anteriormente, entre los elementos traza intrínsecamente más tóxicos se encuentran los metales plomo, mercurio, el semimetal arsénico y el cadmio.^{10,39,224}

Además, los compuestos metálicos pueden cambiar de forma o especie química. Así, los óxidos pueden transformarse en sales, las sales pueden cambiar de ácido y, lo que es más trascendente desde el punto de vista toxicológico, el elemento metálico puede cambiar de grado de oxidación o valencia. Por ello, el As III es más tóxico que el As V¹⁰ y el Cr VI es tóxico mientras que el Cr III^{256,297} es esencial. De esta forma, se observa como puede variar ampliamente la toxicidad tanto cualitativamente como cuantitativamente.

Los efectos tóxicos de los metales se ejercen, salvo raras excepciones, por interacción entre el ión metálico libre y la diana.

Son tóxicos que afectan gravemente a funciones celulares fundamentales para la supervivencia por mecanismos complejos y no siempre bien conocidos. Entre ellos destacan:

- Formación de complejos metal-proteína con inactivación de su función.

A pesar de que los metales en forma elemental se absorben mal por vía cutánea. Éstos, al reaccionar con las proteínas dérmicas, y modificarlas, originan dermatitis alérgicas de contacto. Son ejemplos las que producen las hebillas de níquel y los adornos de diferentes metales.

- Inhibición enzimática de proteínas con grupos tiol (-SH). Dado que, principalmente los metales cuando se hallan en forma iónica, reaccionan con el ion sulfuro (S^{2-}), anión del ácido sulfhídrico, formando sulfuros metálicos extraordinariamente estables y, como consecuencia quedan unidos de forma permanente a los grupos tioles (SH-) de diferentes proteínas y enzimas a las que inactivan o inhiben. Esto constituye la forma más conocida de inhibición enzimática de la que se derivan numerosas repercusiones patológicas.

Por otro lado, los iones metálicos al reaccionar con los grupos SH- de las tiolproteínas (glutación, cisteína...) bloquean la capacidad de éstas para neutralizar a los radicales libres de cualquier origen, impidiendo la acción defensiva contra estos últimos.¹⁴⁷

1.4.4 Efectos sobre la salud

Los elementos traza, como cualquier otro grupo de agentes químicos, pueden producir una patología aguda desarrollada rápidamente tras el contacto con una dosis alta, o bien, una patología crónica por exposición a dosis baja durante un largo período de tiempo.

La toxicidad aguda por metales es poco frecuente. Son muy escasas las intoxicaciones suicidas u homicidas por vía digestiva, capaces de producir cuadros clínicos muy graves o fulminantes que conducen a afectación digestiva, cardiovascular, neurológica o hepatorenal.²¹

Una situación clínica más frecuente es el cuadro de fiebre de los metales o también denominada *Fiebre por humos, fiebre del soldador o fiebre del fundidor*, que surge tras la inhalación, normalmente en ambiente laboral, de vapores de metales o de sus óxidos.

Se ha constatado que los agentes que pueden provocar este cuadro clínico son muy diversos, entre ellos cabe destacar: As, Be, Cd, Co, Hg, Mn, Ni, Sb, Zn...²⁶⁹

La sintomatología que se produce suele coincidir con la de un cuadro febril similar al de un proceso gripal. De hecho, en el momento en el que se interrumpe la exposición los síntomas desaparecen en no más de 24 horas. Por el contrario, la exposición crónica a vapores metálicos puede dar lugar a un enfisema pulmonar.^{41,259}

Por otro lado, las intoxicaciones subagudas o crónicas son predominantes en el entorno laboral (exposición ocupacional)⁷⁵. Con la introducción en las últimas décadas de diferentes regulaciones y normativas tanto a nivel nacional como internacional encaminadas a la protección de riesgos y prevención de la salud de los trabajadores, han ido disminuyendo, de forma paulatina, las enfermedades profesionales.¹⁰³ La mayoría de los protocolos de vigilancia de los trabajadores expuestos comprenden la valoración ambiental del puesto de trabajo a través de controles tanto medioambientales como biológicos. Así, han surgido los valores límites ambientales (VLA) y los valores límites biológicos (VLB) para diferentes agentes químicos.

Las exposiciones a dosis bajas, durante largos periodos de tiempo, procedentes de fuentes alimentarias o ambientales pueden dar lugar a cuadros típicos de intoxicación crónica de origen no ocupacional

Claro ejemplo de intoxicación crónica han sido los sucesos ocurridos en distintos puntos del planeta por consumo de agua de bebida con As dando lugar a cuadros de *Arsenicismo* (intoxicación por arsénico)^{10,38}

Este hecho, ha sido y continúa siendo motivo de preocupación en diversos países como: Argentina, Bangladesh, Camboya, Chile, China, Estados Unidos, Hungría, México, Rumania, Tailandia y Vietnam.^{318,337}

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el período necesario para la manifestación de un cuadro de intoxicación crónica, arsenicosis, oscila entre 5 y 20 años. Al mismo tiempo la OMS estableció en sus *guidelines for drinking water* un valor límite para el As en agua de 10 µg/L, coincidente con lo establecido en la legislación española, mientras que la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA) en Estados Unidos fijó estos mismos valores en 5 µg/L.

Los efectos producidos por el arsénico son muy variados, incluyendo desde problemas leves en la piel, alteraciones en los vasos sanguíneos de los miembros inferiores y trastornos reproductivos, hasta cáncer de piel, vejiga, riñón y/o pulmón. Por otro lado, en diferentes estudios realizados recientemente se ha indicado que pueden producir déficit neurocognitivo en niños.³⁸

Asimismo, la exposición a diferentes metales (plomo, cadmio, manganeso, mercurio...) ³²³ de forma prolongada, en poblaciones susceptibles, a umbrales que incluso se creían seguros, ha sido asociada a efectos adversos en niños tales como: trastornos en la audición y el lenguaje, déficit de atención, disminución del coeficiente intelectual (CI), comportamiento antisocial.³³⁷

La OMS, en 2008 dejaba constancia clara de los hechos al establecer en el *WHO Training package for the health sector* que por cada 1 µg/dL que aumentaba el plomo en sangre, disminuía el coeficiente intelectual entre 0.25 y 0.5 puntos.³⁰¹

Por último, otro posible efecto a largo plazo es la carcinogénesis. La *International Agency for Research on Cancer* (IARC) ha incluido en el Grupo I (Agentes carcinógenos en humanos) a: arsénico, berilio, cadmio, cromo (VI) y níquel²⁰⁸. Circunstancias de exposición clasificadas en el mismo grupo son la producción de aluminio y la fundición de hierro y acero.

1.4.5 Formación de complejos como posibilidad de tratamientos

El conjunto de los elementos metálicos se beneficia de la formación de complejos con diversas sustancias denominadas agentes quelantes. Estos compuestos son capaces de introducir en su molécula a uno o dos átomos del metal, “complejándolo”, es decir, reteniéndolo firmemente pero favoreciendo su excreción.²⁶⁹

A continuación se describen algunas de las características más importantes de los mismos:

- 1.- El quelante debe ser capaz de extraer al metal de sus lugares de depósito.
- 2.- Algunos quelantes, como el BAL -*British Anti-Lewisite*- (dimercaprol), gracias a su liposolubilidad son capaces de penetrar en el sistema nervioso ligándose a los metales presentes en el mismo.
- 3.- Una vez unido el metal al quelante, forma un complejo inactivo dejando de ser tóxico.
- 4.- El complejo inactivo es hidrosoluble y se excreta por la orina.
- 5.- Algunos quelantes pueden desencadenar reacciones alérgicas y anafilácticas lo que hace que su administración tenga que realizarse con las precauciones oportunas.

Los quelantes más utilizados son los siguientes:

- BAL-*British Anti-Lewisite*- (dimercaprol): Se ha utilizado en las intoxicaciones por arsénico, mercurio y plomo.
- DMPS (ácido 2,3-dimercapto-1-propano- sulfónico) y DMSA (ácido meso-2,3-dimercatosuccínico o Succimer): derivados del BAL, hidrosolubles, empleados en la intoxicación crónica por los mismos agentes.
- Derivados del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA): la sal cálcico disódica es capaz de quelar diversos metales pero se ha empleado sobre todo en las intoxicaciones por plomo.
- Penicilamina (β,β -dimetilcisteína): Se emplea por vía oral para las intoxicaciones por plomo, arsénico y mercurio.
- Desferoxamina: forma complejos con el hierro.

1.5 Mercurio

1.5.1 Antecedentes

La ATSDR 1997 (Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades) considera al mercurio como el tercer elemento en el ranking de sustancias peligrosas inmediatamente detrás del plomo y el arsénico^{8,20}.

El mercurio Hg, metal, está presente en el medio ambiente en diferentes formas: mercurio elemental o metálico Hg^0 , mercurio inorgánico Hg (I) y Hg (II) y mercurio orgánico, formando los compuestos (metil, etil y fenilmercurio). Las diferentes formas del mercurio están sujetas a interconversiones principalmente a través de procesos de oxidación-reducción y metilación-desmetilación, procesos que determinan el llamado “ciclo del mercurio”⁵⁴.

El compuesto orgánico del mercurio más abundante en el medio ambiente, es el metilmercurio (MeHg), el cual es generado por los microorganismos (bacterias metanogénicas) mediante el proceso de metilación¹¹².

El metilmercurio (MeHg) es tristemente conocido por su neurotoxicidad, debido a los envenenamientos a los que dio lugar en Minamata (Japón) en los años 50, cuando se vertieron en su bahía subproductos orgánicos de MeHg¹⁵³, y en Iraq, en otoño de 1971 cuando importó gran cantidad de semillas de cebada y trigo tratadas con un fungicida a base de metilmercurio y las distribuyó para su siembra en la primavera de 1972. A pesar de las advertencias oficiales, el grano fue molido y la harina se utilizó para hacer pan^{11,12}. Como resultado, se causaron graves alteraciones neurológicas, particularmente en niños expuestos en el útero materno, dado que es capaz de atravesar las barreras placentarias y hematoencefálicas; originando parálisis cerebral, ceguera, sordera, retraso mental...³⁰²

Más recientemente, diferentes estudios epidemiológicos prospectivos en las islas Feroe y Nueva Zelanda han confirmado que la exposición, incluso a niveles bajos de metilmercurio, origina también alteraciones en el sistema nervioso que afectan a los procesos del desarrollo feto/infantil (memoria, atención, aprendizaje...) ^{117,118,129,131,199}

Numerosos estudios adicionales de exposición dietética en humanos realizados en diferentes comunidades: Canadá, Madeira (Portugal), Amazonia (Brasil), Nuevo México, Perú, Japón, Camboya, Suecia..., han evidenciado efectos adversos en el desarrollo neurológico de los niños a bajas dosis de MeHg ^{9,16,32,137,197,198,287,288}.

La principal fuente de exposición a metilmercurio es la ingestión de pescado contaminado, tanto de agua dulce como de salada y algunos mamíferos marinos. El MeHg tiene una rápida difusión y se une a las proteínas de las algas, plancton y otros microorganismos inferiores, éste, se biomagnifica y bioacumula en la cadena alimentaria acuática. Lo anterior motiva que sean los peces que se encuentran en el nivel trófico superior, los llamados predadores, los que posean niveles mayores de mercurio (tiburón, pez espada, caballa, atún grande, siluro, lucio, etc.) ^{54,314}.

1.5.2 Comités internacionales. Problema de Salud Pública

En año 1993 la Unión Europea, con la finalidad de proteger la salud pública, acuerda en comisión la Decisión 93/351/CEE^{87,89}. En ella, se establecieron los contenidos máximos de mercurio para los productos de pesca. Estos niveles se han ido actualizando progresivamente teniendo en cuenta que, por razones fisiológicas, determinadas especies concentran el mercurio en sus tejidos con más facilidad que otras. El Reglamento N°629/2008 establece el contenido máximo de metilmercurio permitido en 0,5 mg/kg de peso fresco para los productos de la pesca, excepto para algunos específicos en los que se permite 1 mg/kg⁸⁸.

Basándose en los informes preliminares de los estudios epidemiológicos, llevados a cabo en las islas Feroe, la organización FAO (Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) conjuntamente en el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) redujeron el valor del PTWI (Ingesta Tolerable Semanal Provisional) de MeHg, de 3,3 µg/kg peso/semana (JECFA 1978) a 1,6 µg/kg peso/semana (JECFA 2003). Estos valores se corresponden con unos niveles de mercurio en pelo de 2,2 µg/g^{146,203,310,326,327}.

Previamente, en el año 2000, el Centro de Investigación Nacional (NRC) de EEUU, en una evaluación sobre los efectos tóxicos del metilmercurio, ya había establecido una ingesta límite semanal de 0,7 µg/kg peso corporal, un nivel bastante inferior al de la JECFA⁸⁶.

Así mismo, la US-EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente de los EEUU), estableció la Dosis de Referencia de Ingestión de MeHg (RfD) en 0,1 µg/kg peso/día (US-EPA 1997). Estos valores se corresponden con unos niveles de mercurio en pelo de 1 µg/g^{194,326,328}.

En octubre de 2001 a varios estados miembros de la Unión Europea se les encomienda la tarea 3.2.11 de cooperación científica (SCOOP) para la evaluación de la exposición dietética de su población a diferentes metales tóxicos entre ellos el mercurio. El objetivo del proyecto era establecer las bases científicas para la evaluación y manejo del riesgo para la salud procedente de la exposición a arsénico, cadmio, plomo y mercurio a través de la dieta. En este proyecto SCOOP participaron Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Irlanda, Italia, Holanda, Noruega, Portugal, Suecia y Reino Unido. Los resultados indicaban que la mayoría de los países tenían ingestas por debajo del PTWI, pero que existían grupos poblacionales con un alto consumo de pescado y productos marinos que podrían tener ingestas de mercurio muy próximas o incluso superiores al PTWI de 1,6 µg/kg peso corporal^{84,86}.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos del proyecto SCOOP⁸⁶ y la PTWI de la JECFA, el 18 de Marzo de 2004, la Comisión Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) recomendaba en 2004, tener en cuenta el consumo de mercurio a través del pescado en los grupos *vulnerables* (mujeres embarazadas, madres lactantes y niños) pues su ingesta, gracias al MeHg que contienen, podría aumentar el riesgo de lesión en el SNC fetal e infantil⁹². En 2008

este mismo organismo recomendó a las mujeres en edad fértil, embarazadas, madres lactantes y niños,” *comer menos de 100g por semana de pescados predadores*”. Esta institución, insta a cada país a regular en su legislación el consumo de pescado en los grupos vulnerables^{83,84,85,135}

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)^{5,136} hizo suya la guía de recomendaciones establecidas por la OMS, junto con el PNUMA (Programa de Medio Ambiente de las Naciones Unidas) en 2008⁸², que informa sobre el potencial impacto de la exposición a mercurio en las poblaciones más vulnerables.

De nuevo, en 2011, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)⁷ actualizó sus recomendaciones previas realizadas a los grupos más vulnerables de la población¹⁶, como a continuación se observa en la siguiente tabla.

Tabla 4 Recomendaciones realizadas por la AESAN, en 2011, a los grupos más vulnerables de la población.

Pescados	Mujeres en edad fértil embarazadas o en período de lactancia	Niños < 3 años	Niños 3-12 años
Pez espada			Limitar a 50 gr/semana o
Tiburón	Evitar su consumo	Evitar su consumo	100 gr/2 semanas
Atún rojo *			(no consumir ningún otro de los pescados de esta categoría en la
Lucio			misma semana)

Sin embargo, la Comisión Europea, EFSA, es consciente de que la estrategia más eficaz a largo plazo es reducir las emisiones de mercurio y sus usos. Consecuentemente con ello, en la actualidad este es el objetivo clave de la UE^{83,85,90,91}.

A nivel mundial, el Consejo de Administración del PNUMA (en su decisión 24/3)¹³ también determinó que algunas de las medidas prioritarias que se podrían adoptar para reducir el riesgo que plantea el mercurio para la salud humana y el medio ambiente son:

- reducir la demanda mundial de mercurio relacionada con su utilización en productos y procesos de producción y alentar las alternativas.
- reducir el suministro mundial de mercurio, entre otras cosas, considerando la posibilidad de poner freno a la extracción primaria^{305,306} y teniendo en cuenta una jerarquía de fuentes.
- en aquellos casos en los que no existe alternativa, promover iniciativas para detectar, reducir y eliminar las liberaciones de mercurio en el aire, el agua o la tierra a nivel mundial derivadas de la fabricación de productos con mercurio.¹⁹

1.5.3 Fuentes de exposición

1.5.3.1 Exposición laboral

La exposición laboral al mercurio puede provenir de la minería y la industria. Aunque la Comunidad Europea está tomando medidas para buscar alternativas al uso del mercurio y reducir así las emisiones ambientales del mismo, en el último informe⁸⁵ concluyen que el mercurio aún es ampliamente utilizado en una muy variada gama de procesos y productos.

En muchos países dada la toxicidad del mercurio se han reducido los niveles límites de exposición profesional para el mismo. Así, en España, el INSHT¹³⁸ establece un valor límite ambiental para la exposición diaria (VLA-ED) de mercurio elemental y de compuestos inorgánicos que se halla en 0,025 µg/m³, de los alquil-compuestos en 0,01 µg/m³ y de los aril-compuestos en 0,1 µg/m³. En cuanto a los valores límite biológicos VLB para el mercurio

elemental y compuestos inorgánicos, en sangre es de 15 µg/L medido al final de la semana laboral y en orina de 35 µg/g de creatinina medido antes de la jornada laboral ¹³⁸.

En la Unión Europea el principal consumo de mercurio es el producido por la industria cloroalcalina seguido del uso para amalgamas dentales. La industria cloroalcalina produce cloro y alcalinos por electrólisis de salmuera. Las principales tecnologías empleadas para la producción cloroalcalina son las células de mercurio, el diafragma (amianto) y la membrana de celdas electrolíticas.

Todas las instalaciones existentes de la industria cloroalcalina tendrían que haber modificado su proceso de producción desde octubre de 2007. Sin embargo, aunque muchas instalaciones han clausurado total o parcialmente su producción, el informe antes mencionado de la UE, indicaba que se seguían empleando células de Hg ⁸⁵.

Asimismo, la industria cloroalcalina representa el tercer uso en importancia del mercurio en el mundo.

Por otro lado, llama la atención el amplio uso del mercurio como catalizador en la producción de elastómeros de poliuretano donde aproximadamente el 0,2% del mercurio llega al producto final.

Las lámparas que contienen mercurio (tubos fluorescentes, tubos fluorescentes compactos, tubos de descarga de alta intensidad...) siguen siendo las lámparas más comunes de uso eficiente de la energía por lo que es un sector donde el consumo de mercurio continúa en auge. Sin lugar a dudas, cada vez se pueden obtener más fácilmente alternativas sin mercurio, como los diodos que emiten luz (LED).

A nivel mundial, la extracción aurífera artesanal y de pequeña escala sigue siendo la aplicación en la que más se utiliza mercurio. Además está en aumento debido a la tendencia al alza del precio del oro. Es la principal fuente de emisiones y está íntimamente ligada a la pobreza y a la salud de los seres humanos. Un mínimo de 100 millones de personas de más de 55 países dependen directa o indirectamente de esta actividad para su supervivencia, principalmente en las regiones de África, Asia y América del Sur. Con este tipo de extracción se produce entre el 20% y el 30% de la producción aurífera mundial, es decir, entre 500 y 800 toneladas por año. Debido a que las prácticas de extracción son ineficientes, la amalgamación

de mercurio en este tipo de extracción genera un consumo y una liberación de entre 650 y 1000 toneladas de mercurio por año¹³.

Otra actividad que genera una gran preocupación es el uso generalizado y en aumento del cloruro de mercurio como catalizador en la producción de monómeros de cloruro de vinilo (MCV), en su mayor parte en China.⁹⁵

Por último, en las últimas décadas la extracción de mercurio se ha realizado principalmente en tres países que lo extraían para su exportación (España, Kirguistán y Argelia), y en un cuarto país (China) que lo extrae para satisfacer su consumo interno. Ahora bien, tanto España como Argelia en los últimos años han puesto fin a sus operaciones de extracción de mercurio en el año 2003 y en el año 2004 respectivamente.

1.5.3.2 Exposición en la población general

Las fuentes de exposición en la población general son el consumo de pescado y otros productos marinos y las amalgamas dentales³²⁸. Puede haber otras contribuciones considerables a la ingesta de mercurio total vía aire y agua, según la carga local de contaminación por mercurio.

Además, existen otras fuentes como las vacunas u otros productos farmacéuticos, la rotura de un termómetro de mercurio u otro objeto de medida que lo contenga, la utilización de mercurio en rituales religiosos y la exposición a mercurio ambiental en instalaciones con suelos a base de elastómeros de poliuretano³²⁷.

• **Pescado y productos marinos**

En el ciclo acuático del mercurio, el mercurio se transforma en metilmercurio por la acción de determinadas bacterias sulfato reductoras y se bioacumula en los organismos acuáticos incorporándose en la cadena trófica de alimentos. También se biomagnifica, es decir, el contenido de metilmercurio aumenta a medida que aumenta el nivel trófico^{184,321}. Se ha estimado que el nivel de metilmercurio en los diferentes eslabones de la cadena alimentaria

es de un 10% en la columna de agua, un 15% en el fitoplancton, un 30% en el zooplancton y un 95% en los peces. A su vez las concentraciones más bajas de mercurio se encuentran en peces pequeños no depredadores y pueden aumentar varias veces conforme se asciende en la cadena alimentaria. Los peces con mayor contenido de mercurio son los grandes predadores como el pez espada, el tiburón, caballa, el atún o el lucio entre otros.

El 90 a 100% del contenido de mercurio en los peces se encuentra en forma de metilmercurio. Éste se halla unido a las proteínas y no se elimina mediante la limpieza ni cocinado del pescado³¹¹. Aunque en general, el metilmercurio se acumula en los peces a través de la cadena alimentaria, el consumo de pescado procedente de acuicultura también podría suponer una fuente de exposición al metilmercurio por la presencia de éste en los piensos con los que los alimentan.

En España el consumo de pescado constituye la fuente de exposición principal al mercurio en la población general debido al gran consumo del mismo. Dentro de la Unión Europea somos uno de los países con un consumo más elevado, aunque existen grandes diferencias entre los Estados miembros³¹¹. Según los datos del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino en España, durante el año 2008, se registró un consumo de 36 kg per cápita¹⁸⁹.

• **Amalgamas**

La segunda mayor fuente de exposición al mercurio en la población general son las amalgamas dentales. Las amalgamas dentales están compuestas por un 40-50% de mercurio, un 25% de plata y en un 25-35% por una mezcla de cobre, zinc y estaño. Se estudió la liberación de mercurio de empastes de amalgama y se llegó a la conclusión de que las superficies de las amalgamas liberan vapores de mercurio en la boca³⁰⁶. Dependiendo del número de empastes de amalgama, se estima que la absorción diaria promedio de mercurio elemental proveniente de empastes dentales varía entre 3 y 17 µg de mercurio⁸.

• **Proximidad a incineradoras, cementeras, centrales térmicas**

La población general puede estar expuesta a mercurio si vive cerca de incineradoras, cementeras o centrales térmicas. Más del 85% de las emisiones de Hg antropogénicas están generadas por las centrales eléctricas que utilizan combustibles fósiles y la incineración de

residuos (incluidos los municipales y derivados de la actividad sanitaria). En la incineración algunas partículas de Hg elemental se adhieren a las cenizas y se depositan en la tierra, pero la mayor parte de Hg elemental se evapora y permanece en la atmósfera, a veces hasta un año, donde reacciona con el ozono y otros oxidantes para formar compuestos iónicos, sumamente solubles, que se depositan en la tierra o el agua con la lluvia o la nieve. Una porción del Hg iónico es emitido directamente en los procesos de combustión.

• Vacunas

El tiomersal se ha utilizado desde 1928. También conocido como timerosal, es un compuesto que contiene mercurio (aproximadamente en un 50%) y que se utiliza para impedir la proliferación de bacterias y hongos durante el almacenamiento y, sobre todo, durante el uso de viales multidosis de ciertas vacunas. También se ha empleado durante la fabricación de vacunas para la inactivación de ciertos microorganismos y toxinas manteniendo, de esta forma, la esterilidad en la cadena de producción.

Actualmente, tanto en España como en los países de nuestro entorno, se ha hecho un gran esfuerzo a fin de eliminar aquellas vacunas con timerosal siguiendo el principio de precaución.

En la actualidad no hay evidencia de toxicidad derivada del mercurio en las vacunas. Por ello, la OMS, en su comité, no recomienda cambiar la política sobre inmunización en lo que respecta a las vacunas que contienen tiomersal, dado que por el momento la capacidad de producción actual de estas vacunas, sin tiomersal, es limitada e insuficiente para cubrir las necesidades mundiales²⁰⁷, especialmente en los países en vías de desarrollo, en los que por necesidades logísticas se emplean fundamentalmente envases multidosis.

• Rotura de termómetros u otro instrumento de medida que contenga mercurio

La exposición a los vapores de mercurio tras la rotura de un termómetro u otro instrumento de medida que contenga mercurio también puede constituir una fuente de exposición importante. La Orden PRE/222/2009, de 6 de febrero, aplica limitaciones al uso del mercurio en los dispositivos de medición destinados a la venta al público en general, manómetros, barómetros, y en particular a todos los termómetros que contengan Hg, no pudiéndose comercializar a partir del 3 de abril de 2009²⁰⁹.

- **Elastómeros de poliuretano**

El mercurio se utiliza también como catalizador en la producción de elastómeros de poliuretano donde aproximadamente el 0,2% del mercurio llega al producto final al incorporarse a la estructura del polímero. Con el paso del tiempo y sobre todo si está expuesto a abrasión y la radiación ultravioleta, la estructura del polímero se rompe y el mercurio es liberado.

Los elastómeros de poliuretano se utilizan como adhesivos y selladores de alto rendimiento, en pinturas, fibras, componentes de automóvil, en la industria de la construcción, del calzado, del mueble, suelos de gimnasios, guarderías, parques infantiles, minigolfs...

Respecto a este uso, algunos estudios realizados en EEUU en colegios y gimnasios han hallado concentraciones superiores al nivel de referencia establecido por la EPA de 0,3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.⁸⁵

- **Cosméticos y Rituales religiosos**

Existen ciertas cremas y jabones que se utilizan para aclarar la piel que pueden constituir una fuente de exposición al mercurio³²⁸.

Por otro lado, se ha visto que el mercurio elemental se utiliza en ciertos rituales religiosos. En estos rituales añaden mercurio por toda la casa como parte de la ceremonia mágico-religiosa. Al vaporizarse este mercurio los miembros de la casa se ven expuestos al mismo³²⁸.

1.5.4 Toxicocinética

El mercurio se encuentra en la naturaleza en 3 formas diferentes: mercurio elemental, compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos, que presentan diferente solubilidad, reactividad, efectos biológicos y toxicidad.

1.5.4.1 Absorción

El mercurio se absorbe por inhalación, por ingestión y a través de la piel. La vía de ingreso y el tipo de compuesto de mercurio, determinan la concentración y la posibilidad de difusión del mercurio hacia el organismo. Además, la absorción del mercurio depende de factores propios del organismo tales como la edad, el estado fisiológico y la integridad de los tejidos.

a) Inhalación (vía respiratoria)

El mercurio elemental Hg^0 sublima con facilidad a temperatura ambiente gracias a su baja presión de vapor (0,0085mm de Hg a 25°C). Al inhalarse, el vapor de mercurio elemental debido a su carácter lipofílico pasa fácilmente a través de la membrana alveolar pulmonar y entra en la sangre, donde se distribuye a los hematíes, al sistema nervioso central y a los riñones. Aproximadamente se absorbe el 80% del vapor de mercurio elemental.

Generalmente se habla de vapor de mercurio cuando el mercurio elemental se encuentra presente en la atmósfera o de mercurio metálico cuando esta en su forma líquida.

En cuanto a los compuestos inorgánicos (Hg^{1+} , Hg^{2+}) la información disponible es muy limitada pero sugiere que la absorción tiene lugar tras la inhalación de algunos compuestos como los aerosoles de cloruro de mercurio. Clarkson estimó la absorción de estos compuestos vía inhalación en un 40%⁸.

b) Ingestión (vía digestiva)

El mercurio elemental Hg^0 se absorbe muy poco en el sistema gastrointestinal, menos de un 0,1%, por lo que tras la ingesta su toxicidad es mínima.

La absorción de los compuestos inorgánicos depende de varios factores pudiendo variar de un 10-30%. El incremento en el pH intestinal, una dieta rica en lácteos y un

aumento en la actividad pinocítica en el tracto gastrointestinal se han asociado con un aumento de la absorción de mercurio⁸.

Dentro de los compuestos orgánicos se encuentran el metilmercurio, el etilmercurio y el fenilmercurio. Estos compuestos se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal en un 80-95%. En el caso del metilmercurio, la absorción es de aproximadamente un 95% pudiendo verse afectada por la interacción con otros nutrientes de la dieta que pueden reducir su bioaccesibilidad, tales como: fibra, alimentos ricos en fitoquímicos (té verde, té negro...) ^{48,266}

c) A través de la piel (vía cutánea)

La absorción del mercurio elemental a través de la piel es mínima pero sí puede causar síntomas leves en la piel como irritación, dermatitis o erupciones cutáneas.

Existe evidencia científica de que el mercurio inorgánico, presente por ejemplo en cremas y jabones blanqueadores, puede absorberse a través de la piel ^{8,328}.

La absorción dérmica de compuestos dialquilmercuriales, como el dimetilmercurio es elevada, al igual que en el caso del fenilmercurio.

1.5.4.2 Distribución

El mercurio metálico Hg^0 se distribuye por todo el organismo tras la inhalación del mismo, atravesando fácilmente la barrera hematoencefálica y la placenta debido a su elevada lipofilia. Una vez oxidado a catión mercúrico, se acumula principalmente en los riñones. Los compuestos inorgánicos de mercurio divalente Hg^{2+} alcanzan todos los órganos de forma similar

Los compuestos orgánicos se distribuyen especialmente en los riñones tras la exposición oral, y al igual que el mercurio metálico, éstos, pueden atravesar la barrera hematoencefálica y la placenta acumulándose en cerebro y feto.

Sin embargo, debido a la impermeabilidad de la barrera hematoencefálica al mercurio mercúrico (Hg^{2+}), todo el mercurio divalente que se halle en el tejido cerebral, en la placenta y el feto procederá de la oxidación del mercurio elemental y no será capaz de volver en esta forma química a la circulación general. Además, con el tiempo el mercurio divalente se une a especies de selenio formando complejos HgSe , que son insolubles y residen en el cerebro durante años^{53,227}. El proceso de la oxidación del vapor de mercurio está mediado en parte por la catalasa. En esta reacción se transfieren dos electrones del átomo de mercurio al átomo de oxígeno.

En el caso de las amalgamas dentales que contienen un 45% de mercurio elemental, la masticación libera el vapor de mercurio. La respiración por la boca transporta el vapor de mercurio a los alvéolos del pulmón donde el 80% del vapor inhalado pasa a la circulación sanguínea. Parte del mercurio elemental procedente de las amalgamas se oxida a mercurio divalente y pasa con la saliva al tracto gastrointestinal dónde se absorbe un máximo de un 20%⁵³.

El metilmercurio se absorbe de forma muy eficiente en el tracto gastrointestinal. Pasa a la sangre y se distribuye por todos los tejidos atravesando fácilmente la barrera hematoencefálica y la placenta. En el tracto gastrointestinal, una fracción del metilmercurio entra en contacto con la flora intestinal que es capaz de convertir el metilmercurio en mercurio inorgánico, que como tiene una absorción muy baja, se elimina en parte por las heces. Una vez absorbido, el metilmercurio se une al grupo tiol del aminoácido cisteína, formando un complejo con una estructura muy similar a la metionina, por lo que entra en las células mediante los transportadores de aminoácidos neutros (LAT1 y LAT2)²⁶⁸. De hecho, el transporte del complejo metilmercurio - cisteína es inhibido por aminoácidos como la metionina.

De manera que existen dos mecanismos de transporte para el metilmercurio: uno el mencionado anteriormente de la formación de complejos con cisteína para entrar en las células mediante los transportadores de aminoácidos neutros y otro, sería la formación de complejos con glutatión para salir de las células mediante los transportadores endógenos de glutatión. Sin olvidar que las enzimas de superficie gamma glutamil transpeptidasa y dipeptidasa pueden tener un papel muy importante en la conversión del metilmercurio

extracelular en el complejo metilmercurio- cisteína que se absorbe con gran facilidad de nuevo.

1.5.4.3 Excreción

La excreción urinaria de mercurio procede de la liberación directa del tejido renal y de la filtración glomerular. La excreción a través de las heces es también una importante fuente de eliminación de mercurio inorgánico. El proceso se inicia con la excreción de mercurio del hígado a través de la bilis mediante la formación de un complejo con glutatión y de aquí pasa al tracto gastrointestinal y se elimina del organismo^{8,53}.

El mercurio elemental se oxida a mercurio divalente en la mayoría de los tejidos, especialmente en cerebro y riñones, donde permanece durante décadas. Su eliminación tiene lugar a través de la orina y las heces. Tras la oxidación del mercurio elemental a mercurio divalente, la mayoría de éste, es excretado en la orina en forma iónica. Una parte del mercurio elemental presente en la circulación sanguínea se exhala directamente a través de los pulmones, aunque esta vía no contribuye significativamente a la eliminación del mercurio del organismo

El mercurio iónico se excreta principalmente a través de la orina y heces, pero también puede excretarse a través de la leche materna. Su vida media en sangre es de 20-66 días. La mayoría del mercurio divalente absorbido vía oral se excreta a través de las heces, aunque permanece en el organismo durante un período variable de tiempo⁸.

El metilmercurio tiene una vida media en sangre relativamente larga, se estima que varía entre 44-80 días. La excreción de metilmercurio tiene lugar principalmente a través de las heces, el cabello, y en una proporción inferior a un tercio de la excreción total, por orina³⁰⁰. El metilmercurio también se puede excretar a través de la leche materna^{8,308}.

1.5.5 Efectos sobre la salud

Los factores que determinan la aparición de efectos adversos y su severidad son: forma química del mercurio, dosis, edad, duración de la exposición, ruta de exposición (inhalación, ingestión o contacto dérmico) y el hábito dietético de consumo de pescado y marisco.

El mercurio y sus compuestos son especialmente tóxicos para el sistema nervioso, riñones y sistema cardiovascular. Otros sistemas que pueden verse afectados son el sistema respiratorio, gastrointestinal, hematológico, y reproductivo³²⁸.

1.5.5.1 Mercurio elemental y compuestos inorgánicos

Tras una exposición a mercurio elemental los efectos adversos más importantes se deben a su toxicidad sobre el sistema nervioso. A concentraciones elevadas se afectan los riñones, la glándula tiroidea y el sistema respiratorio.

a) Efectos neurológicos

Los informes de exposiciones accidentales a altas concentraciones de vapores de mercurio, así como de estudios de poblaciones crónicamente expuestas a concentraciones potencialmente elevadas han mostrado efectos en una amplia variedad de funciones cognitivas, sensoriales, motoras y de la personalidad. En general, se ha observado que los síntomas disminuyen al interrumpirse la exposición. Sin embargo, se han observado efectos persistentes (temblor, déficits cognitivos) en sujetos expuestos en su trabajo 10 a 30 años después del cese de la exposición¹⁶³. Asimismo, se han descrito algunos casos de temblores de las manos y/o trastornos del sueño, ira, fatiga y problemas de memoria en trabajadores crónicamente expuestos a una concentración atmosférica estimada de $0,025 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (aproximadamente equivalente a niveles de mercurio en la orina y la sangre de unos $25 \mu\text{g}/\text{g}$ y $10 \mu\text{g}/\text{L}$)³⁰⁶ no observándose con niveles de exposición algo inferiores y una concentración de mercurio en la orina de $10\text{-}15 \mu\text{g}/\text{g}$ ^{78,223}.

También se ha observado una disminución significativa en las medidas objetivas de las funciones cognitivas y/o motoras en las poblaciones expuestas.

Varios estudios demuestran sistemáticamente los efectos sutiles que ejercen en el sistema nervioso central las exposiciones laborales al vapor de mercurio³⁰⁶. Se han observado trastornos neurológicos y de comportamiento. Los síntomas incluyen temblores que se inician en las manos y se extienden a otras partes del cuerpo, labilidad emocional que se caracteriza por irritabilidad, excitación, timidez excesiva, pérdida de confianza y nerviosismo, insomnio, alteraciones neuromusculares como debilidad y atrofia muscular, dolor de cabeza, polineuropatías como parestesias, pérdida de sensibilidad, hiperreflexia tendinosa, disminución de la velocidad de conducción nerviosa motora y sensitiva, pérdida de memoria y bajo rendimiento en las pruebas de función cognitiva¹⁸⁵

b) Efectos renales

El riñón es, junto con el SNC, un órgano crítico en la exposición al vapor de mercurio, acumulando, en mayor medida que otros tejidos, ese compuesto inorgánico de mercurio.

Un alto nivel de exposición podría provocar glomerulonefritis (mediada por complejos inmunes) con proteinuria y síndrome nefrítico pero los casos señalados son relativamente escasos. Por lo tanto, probablemente sea necesario que haya una susceptibilidad genética específica para que se manifieste claramente una nefritis. A altas exposiciones, lo más frecuente es la proteinuria, tanto glomerular como tubular. En exposiciones de bajo nivel, se ha señalado un efecto en los túbulos renales, que se manifiesta por un aumento en la excreción de proteínas de bajo peso molecular, y que puede constituir el efecto biológico más precoz. Ese efecto aparece con una exposición laboral en trabajadores que presentan una concentración de mercurio en la orina de unos 10 µg/g de creatinina³⁰⁶.

c) Otros efectos

En el aparato respiratorio la toxicidad de la exposición a vapores de mercurio elemental se manifiesta por congestión y edema pulmonar, tos, neumonitis intersticial e insuficiencia respiratoria ³⁰⁶.

A nivel cardiovascular algunos signos de la toxicidad son taquicardia, elevación de la presión sanguínea y palpitaciones⁸. El Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas y el ATSDR señalaron que la exposición aguda a la inhalación de altas concentraciones de vapores de mercurio elemental procedentes del calentamiento de mercurio elemental y de compuestos inorgánicos de mercurio produce un aumento de la presión sanguínea y palpitaciones³²⁹.

El signo más común en el aparato digestivo es la estomatitis, que generalmente aparece tras exposición a una alta concentración de vapores de mercurio elemental. Otros efectos gastrointestinales que aparecen con frecuencia son náuseas, vómitos, diarrea y cólicos abdominales.

Por otro lado, la glándula tiroides puede acumular mercurio cuando se produce una exposición prolongada³⁰⁶. Algunos autores han observado que una exposición laboral moderada afecta a la glándula tiroides cuando los niveles de mercurio en la orina son de 15-30 µg/g de creatinina. El mercurio produce un aumento en la concentración sérica media de la triyodotironina inversa (T3r) y un aumento de la proporción de T4 libre y T3 libre. Sin embargo, Ellingsen y col. señalaron asimismo que “la función de conjunto de la glándula tiroidea, evaluada midiendo la TSH y las hormonas tiroideas, parece conservarse en los trabajadores expuestos a niveles bajos de mercurio elemental”⁷⁷.

Asimismo, a nivel cutáneo la exposición a vapores de mercurio elemental de duración intermedia o aguda puede resultar en una respuesta conocida como acrodinia, condición caracterizada por un aumento de la sensibilidad de las plantas de los pies y palmas de las manos con sensación de hormigueo seguida de una erupción eritematosa con exfoliación y pigmentación parda de las extremidades.

Por último, diferentes estudios sobre la exposición laboral indican que se puede afectar la reproducción humana. Los efectos posibles son un aumento de abortos espontáneos, anomalías congénitas y una disminución de la fertilidad en las mujeres.

1.5.5.2 Metilmercurio

La toxicidad del metilmercurio es mucho mayor que la de los compuestos inorgánicos de mercurio. Los efectos perjudiciales del metilmercurio mejor documentados son los que se producen sobre el desarrollo del sistema nervioso en el feto y el recién nacido. Es un potente neurotóxico y el sistema nervioso del feto en desarrollo es el órgano diana.

a) Efectos neurológicos

Los efectos nocivos del mercurio y específicamente del metilmercurio se conocen desde finales de los años 50, debido a la intoxicación masiva que se produjo por el consumo de pescado contaminado en la bahía de Minamata (Japón)¹²². La prevalencia general de trastornos neurológicos y mentales en la región de Minamata era de 59%. Estos efectos se centraban principalmente en el SNC y diferían dependiendo de si se afectaba un SNC en desarrollo o adulto. En adultos el daño provocado por MeHg va dirigido a estructuras cerebrales específicas como la capa de células granulares de cerebelo y la corteza visual. En cambio, los efectos del MeHg en cerebros en desarrollo son más difusos y extensos dado que afectan a procesos de formación de microtúbulos, migración neuronal y división celular^{40,59}. En cerebros en desarrollo, el tiempo de inicio de la exposición al tóxico correlaciona con la severidad de los efectos inducidos, es decir cuánto más temprana sea la exposición, mayores son los efectos observados en el cerebro. Los signos clínicos más comunes en los adultos fueron parestesias periorales y distales, ataxia, estrechamiento del campo visual, problemas de audición, trastornos del habla, temblores de manos y pies, etc. En los casos graves se producía una encefalopatía grave que conducía al coma y a la muerte. En 1965, la mortalidad fue del 44,3%. Las concentraciones de mercurio en el pelo estuvieron comprendidas entre 50 y 700 µg/g.

El metilmercurio atraviesa la placenta por lo que los niños afectados intraútero presentaban un cuadro análogo a una parálisis cerebral grave, con un grave retraso en el desarrollo, ceguera, sordera y alteraciones del tono muscular y de los reflejos tendinosos profundos³⁰⁶.

Otro incidente de gran magnitud, fue el ocurrido en Irak, en el otoño de 1971. Los síntomas y signos del envenenamiento por metilmercurio así como los cambios histopatológicos también se centraban en el SNC. Los síntomas aparecían en promedio de 1 a

2 meses tras la exposición. La concentración de mercurio en sangre era mayor en los recién nacidos y en los niños de corta edad, que podían haber estado expuestos intraútero o durante la lactancia, que en los adultos. En los niños se observó retraso mental, retraso en las etapas del desarrollo, alteraciones del tono muscular y de las funciones sensoriales. Además, aparecieron muchos afectados de ceguera y sordera. En adultos, los síntomas dependían de la dosis y, entre las personas más gravemente afectadas, se observó ataxia, visión borrosa, alteraciones del lenguaje y dificultades de audición^{11,12}.

A diferencia de las exposiciones a largo plazo que tuvieron lugar en Japón, la epidemia de envenenamiento por metilmercurio que ocurrió en Iraq fue de corta duración, pero la magnitud de la exposición fue grande.

Analizando los estudios de estas graves intoxicaciones, la OMS estimó que el 5% de los adultos expuestos a metilmercurio experimentarían efectos neurológicos con una concentración en sangre de 200 µg/L (lo que corresponde en cabello aproximadamente a 50 µg/g). Sin embargo, esta estimación fue cuestionada por Kosatsky y Foran al reanalizar estos estudios y sugerir que la concentración más baja de mercurio que produce alteraciones clínicas era probablemente muy inferior¹⁸⁴.

Tras estos lamentables incidentes, las investigaciones se dirigieron a conocer los riesgos que suponía para la salud pública una exposición crónica a bajas concentraciones de metilmercurio, por un consumo habitual de pescado.²⁶⁷

Grandes estudios epidemiológicos han ido mostrando que el metilmercurio de la dieta de mujeres embarazadas constituida por productos marinos parece producir efectos sutiles y persistentes en el desarrollo mental de los niños, que se observan desde el comienzo de la edad escolar. Estos efectos se producen aunque el mercurio se encuentre en concentraciones bajas, alrededor de 1/10 - 1/5 de las concentraciones que producen efectos observados en adultos.

El primero de estos estudios se realizó en Nueva Zelanda. De una cohorte de 11.000 mujeres que habían tenido un hijo en 1978, se determinó el mercurio en 1.000 mujeres que referían haber comido pescado 3 veces a la semana durante el embarazo. En 73 mujeres se observaron cifras por encima de 6 µg/g de mercurio en cabello, constituyendo el grupo de

alta exposición. En el primer seguimiento, a los 4 años, se examinaron a 31 niños de este grupo de elevada exposición y 31 niños controles con baja exposición y fueron pareados para factores de confusión (grupo étnico de la madre, edad, lugar y fecha de nacimiento). El grupo de exposición elevado mostró puntuaciones significativamente inferiores en el Denver Development Screening Test, que es un test estandarizado que evalúa el desarrollo mental y motor del niño.

De la cohorte original se hizo un seguimiento a la edad de 6 años. Se tomaron 61 niños del grupo de elevada exposición, se dividieron en tres grupos y se parearon con 3 grupos control. Un grupo cuyos niveles de mercurio en la madre habían sido de 3-6 µg/g, y dos grupos con niveles menores a 3 µg/g. Los grupos se parearon para las siguientes variables de confusión: grupo étnico, edad, lugar de residencia, sexo del niño y número de comidas de pescado. Se evaluó la función psicológica con la escala Wechsler de inteligencia para niños (WISC-R), la función motora y sensorial mediante la escala de habilidades infantiles de McCarthy y una prueba de evaluación del desarrollo del lenguaje oral. Se observaron peores puntuaciones, estadísticamente significativas, cuanto mayor era la concentración de mercurio en el pelo de la madre. Hallaron una disminución de 3 puntos en el cociente intelectual, en los niños cuyas madres tenían concentración de mercurio en el pelo mayores de 6 µg/g^{51,149,302}.

Otro de los grandes estudios se realizó en las islas Feroe, situadas en el Atlántico Norte entre Noruega e Islandia. En este archipiélago la población tiene una exposición elevada a metilmercurio por su costumbre de pescar y consumir ballenas calderón. Sin embargo, en el estudio se observó que el consumo de pescado era variado aunque se asociaba con la ingesta de calderón. La primera cohorte consistió en 1021 niños nacidos durante un período de 21 meses entre 1986-1987¹¹⁷. La exposición prenatal a metilmercurio se estimó mediante la determinación de la concentración de mercurio total en cordón umbilical y cabello materno. Un total de 917 niños (el 90.3%) participaron a los 7 años en una exploración neurológica minuciosa que incluía pruebas neurológicas funcionales, evaluación de la función sensorial y pruebas de coordinación motora. Además se hizo especial hincapié en la evaluación de la función neurofisiológica y neuropsicológica mediante test específicos. A los 14 años se repitió la evaluación, de nuevo, con una tasa de participación muy elevada⁶¹.

Tanto a los 7 como a los 14 años se observó que las áreas más afectadas y que mostraban asociación con la exposición prenatal a metilmercurio eran la atención, el lenguaje

y la memoria verbal y en menor medida la velocidad motora y la función visuoespacial. Observaron que al doblar la concentración de mercurio se producía una disminución de 1,5 (0,85- 2,4) puntos en el cociente intelectual³⁰².

Se controlaron factores de confusión como la edad, sexo y los bifenilos policlorados (PCBs), estos últimos, neurotóxicos que podrían potenciar la neurotoxicidad del MeHg¹³². A su vez, se observaron latencias retardadas de los potenciales evocados auditivos y una disminución de la variabilidad del ritmo cardíaco asociándose con la exposición a mercurio^{51,61,116}.

De manera que los resultados de este estudio mostraron que los efectos sobre el sistema nervioso central debidos a la exposición a metilmercurio son multifocales y permanentes. Además se estableció que el mejor biomarcador de exposición era la sangre del cordón umbilical.

Otro de los grandes estudios de cohorte que se diseñaron para ver a nivel poblacional los efectos del metilmercurio es el de las islas Seychelles, situadas en el océano Índico, al noreste de Madagascar. La cohorte piloto incluía 800 madres. A los 66 meses se evaluaron 217 niños con los siguientes test: el McCarthy General Cognitive index, el Perceptual Performance subscale, el Preschool Language Scale Total Language y la subescala de comprensión auditiva. Se observó una asociación negativa con el contenido en mercurio en pelo materno. Sin embargo, cuando los autores eliminaron los aparentes valores extremos, únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas con la comprensión auditiva.

El estudio completo incluyó una evaluación de los niños a los 6,5; 19; 29 y 66 meses y a los 8 años. En general no se observó una asociación clara entre las áreas evaluadas y el contenido de mercurio en el cabello materno, a excepción, de una disminución en la destreza motora fina (mayor tiempo para completar el *grooved pegboard test* con la mano no dominante) en los casos que habían tenido una exposición fetal a mercurio más elevada²⁰⁰.

Se ha intentado dilucidar el porqué de estas diferencias entre estos estudios. Factores como el tipo de biomarcador de exposición considerado pueden influir en estas diferencias. En las islas Feroe se evidenció que aunque también recogieron y analizaron cabello de la

madre, el mejor biomarcador de exposición era la sangre del cordón umbilical. En Nueva Zelanda utilizaron cabello materno recogido tras el parto, sin embargo, en el estudio de las islas Seychelles, la muestra de cabello materno se recolectó 6 meses después del parto, por lo que identificaron el segmento que representó el embarazo, asumiendo que el cabello crece 1,1 cm por mes, hecho éste, que podría haber conducido a errores⁵¹. Además, las pruebas neurocognitivas y neuroconductuales tienen connotaciones culturales y las traducciones pueden degradar la validez de los mismos cuando se aplican en otros países como en las Islas Seychelles³⁰². Por ello, tiene gran importancia que se observen diferencias significativas en una prueba como el *groove pegboard test*, que no tiene connotación cultural.

Asimismo, se han propuesto otras hipótesis como la ingesta de algunos nutrientes que pudieran modificar el metabolismo o la toxicidad del mercurio¹⁸⁴.

En el año 2000 la Academia Nacional de las Ciencias y el Centro de Investigación Nacional (NAS/NRC) de EEUU opinaron que el estudio más fiable era el de las Islas Feroe y concluyeron que existía una fuerte evidencia de la neurotoxicidad fetal del metilmercurio. Los aparentes resultados negativos de las islas Seychelles, no les disuadieron ya que creían se debían a que la cohorte era más pequeña que la de las islas Feroe y que sólo tenía el 50% de potencia estadística para detectar los efectos hallados en el otro estudio¹⁸⁴.

Aunque como se ha comentado anteriormente los efectos perjudiciales del metilmercurio mejor documentados son los que se producen sobre el desarrollo del sistema nervioso en el feto y el recién nacido, cada vez hay más estudios que indican que el metilmercurio también puede afectar a la función cognitiva en adultos.

b) Efectos cardiovasculares

En los últimos años han aumentado los estudios que relacionan los efectos nocivos del metilmercurio sobre el sistema cardiovascular en adultos. Parece ser que podría aumentar el riesgo de infarto agudo de miocardio y de cardiopatía isquémica, hipertensión e incluso produciría alteraciones en la variabilidad del ritmo cardíaco ^{33,45,184,341}

Es de destacar el hecho de que estos efectos adversos sobre el sistema cardiovascular se observan con concentraciones de mercurio muy inferiores a las asociadas con neurotoxicidad^{121,316}.

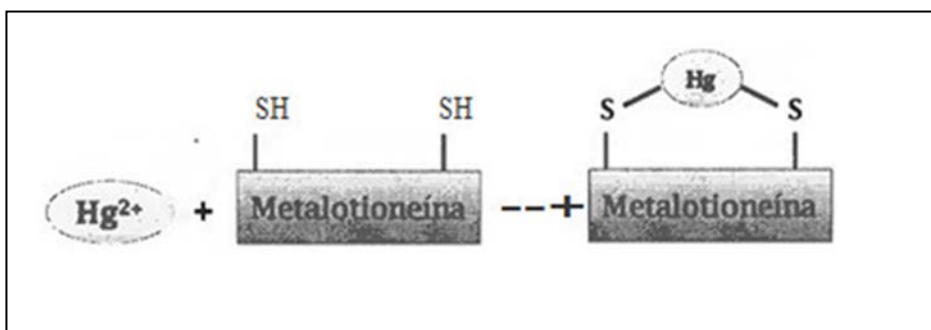
Sin embargo, en otros estudios realizados en profesionales de la salud en EEUU no se han encontrado claras asociaciones entre mercurio y enfermedad coronaria.

Mecanismos de acción del metilmercurio

La liposolubilidad de los compuestos de mercurio promueve su acumulación en compartimentos muy ricos en lípidos como el cerebro.

La elevada afinidad del MeHg por los grupos tioles convierte a las proteínas o péptidos que contienen residuos de cisteína en moléculas susceptibles de ser modificadas estructural y funcionalmente en cualquier compartimento subcelular. En los sistemas biológicos, el MeHg se halla formando complejos con cisteína, homocisteína, metalotioninas, glutatión o albúmina entre otros, por lo que no existe un único mecanismo ni una única molécula diana capaz de explicar la multitud de efectos neurotóxicos inducidos por el MeHg en el SNC.

Figura 4 Enlace del mercurio a las metalotioneínas a través de los grupos sulfidrilos



Además de los efectos nocivos en la estructura celular del sistema nervioso, otros elementos como la transmisión nerviosa (receptores, señalización celular, síntesis, degradación y transporte de neurotransmisores), la homeostasis del calcio, los procesos relacionados con la respiración mitocondrial y la obtención de energía y finalmente la síntesis de proteínas ADN y ARN se barajan como las principales dianas del MeHg en el sistema nervioso⁴⁰.

El metilmercurio produce inhibición de la síntesis de proteínas y alteración de la fosforilación de las mismas.

El ión calcio desempeña un papel crítico en los procesos de muerte celular en el sistema nervioso. De hecho, diferentes trabajos realizados con distintos modelos neuronales han demostrado que las exposiciones a corto plazo a MeHg alteran la homeostasis del calcio⁴⁰.

El citoesqueleto, implicado en el movimiento y en procesos de división celular es una de las dianas específicas del MeHg, y en especial los microtúbulos. La integridad de los microtúbulos es fundamental en el desarrollo del sistema nervioso, la proliferación celular, la migración de células mitóticas durante la formación de la corteza cerebral y cerebelar y en la extensión y estabilización de las neuritas junto con el transporte axodendrítico. Asimismo, los efectos del mercurio sobre la transmisión sináptica pueden ocasionar debilidad muscular y alteraciones en el SNC.

Además, el cerebro es un órgano especialmente vulnerable al estrés oxidativo debido a la elevada tasa de actividad metabólica oxidante, a la alta demanda energética para el transporte de neurotransmisores e iones, a la elevada concentración de sustratos oxidables como los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas, a la generación endógena de ROS, a la alta relación superficie de membrana/volumen citoplasmático y finalmente a los bajos niveles de mecanismos intracelulares de protección (GSH, melationinas, catalasa y glutathion peroxidasa). El estrés oxidativo, asociado a una acumulación de especies reactivas tóxicas (EROs, especies reactivas de nitrógeno) procedente de la alteración del equilibrio entre los componentes celulares prooxidantes y antioxidantes, es un factor fundamental de la neurotoxicidad mediada por MeHg. El MeHg es capaz de alterar distintas funciones mitocondriales incluyendo la respiración y la fosforilación oxidativa además de inducir cambios en la concentración de calcio mitocondrial. De igual forma, es capaz de alterar la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo III (ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa) de la cadena respiratoria mitocondrial, traduciéndose en un incremento de EROs, una depleción de GSH y un aumento de la peroxidación lipídica. A su vez, es capaz de reducir los niveles de ATP intracelular en células granulares del cerebelo promoviendo la apertura del poro de permeabilidad transitoria en la mitocondria, proceso irreversible, que se acompaña de una hinchazón de la mitocondria que conduce a la liberación de Ca^{+2} , de factores mitocondriales como el citocromo c y del factor inductor de apoptosis. Los

antioxidantes ejercen una mayor protección de la muerte neuronal inducida por MeHg que los inhibidores de canales y transportadores de calcio, lo que indica que el estrés oxidativo es la principal causa de neurotoxicidad.

La neurodegeneración provocada por MeHg cursa tanto con apoptosis como con necrosis, dos tipos de muerte celular bien diferenciadas morfológica y molecularmente, dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición.

A nivel cardiovascular existen varios mecanismos de acción por los que el mercurio produce efectos cardiotóxicos^{252,253}. La oxidación de la LDL se considera el acontecimiento clave en el desarrollo de la aterosclerosis. El mercurio tiene una elevada afinidad por los grupos sulfidrilo del glutatión, N-acetilcisteína, ácido alfa lipoico, etc. que proporcionan del 10- 50% de la capacidad antioxidante proteica del plasma. La disminución de la disponibilidad de estos antioxidantes reduce las defensas e incrementa el estrés oxidativo.

El mercurio tiene mucha afinidad por el selenio, uniéndose a él y formando complejos insolubles. De esta manera el mercurio reduce la biodisponibilidad del selenio y, por consiguiente, la actividad de la glutatión peroxidasa, promoviendo así la peroxidación lipídica y la aterosclerosis. Además, el mercurio puede producir inactivación de la superóxido dismutasa, la catalasa y la paraoxonasa y dado que es un metal de transición puede actuar como catalizador en las reacciones tipo Fenton, que tienen como resultado la formación de radicales hidroxilo muy reactivos, induciendo disfunción mitocondrial y estrés oxidativo.

Como punto final, ha quedado patente los numerosos efectos tóxicos del mercurio tanto en estudios *in vitro*, como en animales y en humanos.

1.6. El pelo como matriz

Las primeras aplicaciones del análisis del pelo como matriz biológica en la determinación de metales se llevaron a cabo para la realización de análisis toxicológicos y

forenses. El primer caso de determinación de venenos en pelo humano fue publicado en *Caspers Praktisches Handbuch der Gerichtlichen Medizin* (Casper, 1858), donde se determinó arsénico en pelo de un cadáver exhumado 11 años después de la muerte. Posteriormente, Kohn-Abrest (1934), escribió que el nivel de arsénico en pelos y cabellos de individuos normales era de "unas centésimas de miligramo por cien gramos de pelo".

La cantidad de muestra que se precisaba con la tecnología de entonces era elevada y experimentó una drástica reducción con la introducción de técnicas mas evolucionadas como la activación neutrónica³⁴²...

Investigadores de Canadá, Japón, Suecia y Estados Unidos durante la década de los setenta informaban que las concentraciones de plomo, arsénico, cadmio y mercurio en cabello proporcionaban un calendario de la exposición a estos metales que era relativamente seguro, fiable y permanente (Hambridge et al., 1976; Pihl et al., 1980)^{52,101}.

En 1976, el análisis de cinc en cabello permitió, a un grupo de investigadores de Denver, Colorado, establecer que los niños de familias pobres poseían concentraciones de Zn en pelo considerablemente inferiores a las de los niños de familias de clase media y alta, lo que podría deberse a la nutrición más deficiente (Hambridge et al., 1976). En ese mismo sentido, en otro estudio se informaba de que los alumnos con las calificaciones más altas se podían distinguir de los que presentaban dificultades para aprender, considerando las diferencias en las concentraciones de Zn, Cu, Pb, y Cd en su pelo (Pihl et al., 1980).

A pesar de que el análisis en pelo esta ampliamente aceptado para la determinación de gran número de elementos tóxicos (xenobióticos), su utilización para la determinación de otros elementos traza sigue originando controversias, aun cuando permite la determinación de éstos en el diagnóstico de desórdenes metabólicos, evaluación del status nutricional y exposición medioambiental incluyendo las variaciones en largos periodos de tiempo^{234,282}.

En esa misma línea, el pelo es considerado un biomarcador adecuado en diferentes estudios epidemiológicos²⁰³. Un ejemplo de esta utilización lo tenemos en los estudios realizados en diferentes países afectados por epidemias de arsenicosis.

Por otro lado, podría estar limitada su utilización a nivel ocupacional dado que, el medioambiente laboral puede encontrarse contaminado con algún elemento tóxico y el pelo,

en este caso, podría estar sujeto a contaminación exógena. Sin embargo, al mismo tiempo identificar elevados niveles de un elemento podría ser suficiente para sugerir la existencia potencial de exposición e implicar la necesaria toma de medidas.

Recientemente se han empezado a utilizar el pelo, el sudor y la saliva^{167,181,33} como matrices alternativas y complementarias a las de sangre y orina. Cada una de estas matrices posee unas características especiales, que nos proporcionan una información distinta y tienen, por tanto, sus ventajas y sus inconvenientes.³³⁰

En este sentido, el CDC (Centro de Control y Prevención de Enfermedades en Estados Unidos) que conduce la encuesta poblacional National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), para evaluar la salud y el estado nutricional de la población estadounidense, incluye la determinación de los niveles de Hg en pelo en niños y adultos.

Asimismo, el HBC (Comisión para la Biomonitorización Humana en Alemania) establece unos valores de referencia de elementos traza para la población adulta e infantil en función de los datos obtenidos de la encuesta poblacional GERES (German Environmental Survey) que introduce el pelo para la determinación de estos elementos²⁶².

De igual manera, otros países (República Checa²⁸, Bélgica, Canadá...) como parte integrante de su sistema de Biomonitorización de la salud Humana han incluido la determinación de elementos traza en pelo para el establecimiento de valores de referencia en su población.

La ATSDR en 2001, en su *Hair Analysis Panel Discussion*, reconocía que el análisis del pelo era una herramienta adecuada tanto a nivel de exposición medioambiental como a nivel de diagnóstico clínico.

Al mismo tiempo, en esta misma reunión del *Hair Analysis Panel*, se exponía la necesidad de *estandarizar u homogeneizar el análisis de elementos traza en pelo* a fin de intentar minimizar los factores que podían alterar la fiabilidad de los resultados. Desde entonces, se ha avanzado mucho y se han introducido innumerables mejoras en este campo mediante la protocolización en el muestreo (zona capilar, distancia a la raíz...), inclusión de técnicas de lavado (con la finalidad de eliminar contaminación externa) y preparación uniforme de la muestra. Además, con el empleo cada día mayor de equipos más sofisticados que mejoran

increíblemente los límites de detección y junto con la introducción de materiales de referencia certificados se ha conseguido convertir a esta matriz en una muestra de excelentes capacidades²¹⁷.

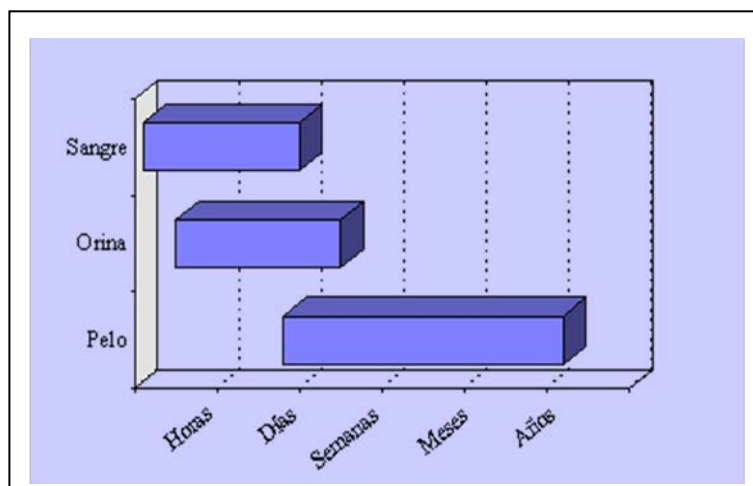
Los únicos retos que permanecen sin haber sido cumplidos en su totalidad son:

- La dificultad para distinguir, en algunos casos, si la presencia de estos elementos en el pelo procede de un depósito externo, o bien de una incorporación interna desde el folículo. Esto no sería una limitación, si el elemento en cuestión no posee una fuente externa de contaminación. Ej. Metilmercurio¹⁵⁵
- Dificultad para el establecimiento de valores de referencia universalmente aceptados.^{186,155}

Por otro lado, este tipo de matriz posee innumerables ventajas, dado que, se trata de una muestra muy fácil de conseguir, que no requiere de técnicas invasivas ni dolorosas para su obtención, lo que la convierte en una muestra especialmente atractiva para la población pediátrica^{179,251}. Es, por tanto, un espécimen física y químicamente estable y fácilmente almacenable. Todo ello, hace de él un adecuado biomarcador para estimar la entrada y exposición a elementos traza.²³⁸

Otra cualidad que le hace distinta de otro tipo de muestras es, que a diferencia de los especímenes sangre y orina que representan el estatus actual del organismo, la matriz pelo indica un período de tiempo prolongado, pudiendo por ello emplearse con fines retrospectivos¹⁵⁰

Figura 5 Periodos de tiempo indicativos de cada tipo de muestra



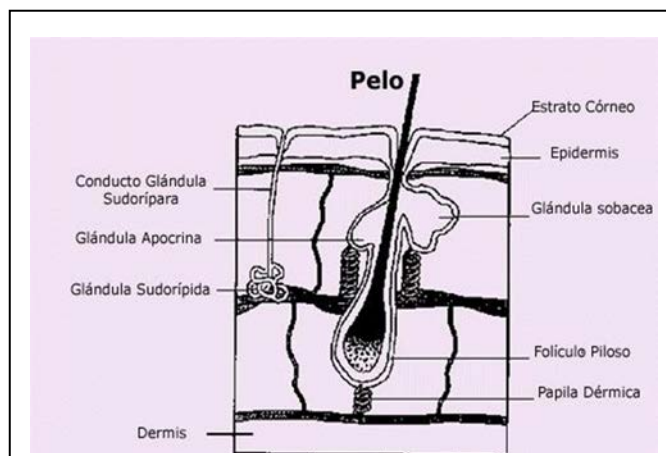
1.6.1 Anatomía y fisiología del pelo

Para poder interpretar adecuadamente los análisis en dicha muestra es necesario conocer su biología.

Folículo piloso

El pelo crece por elongación de las células del centro germinativo de la papila, situado en la base del folículo piloso. Los folículos están encajados en el epitelio dérmico a 3 ó 4 mm debajo de la superficie de la piel, y pueden ser considerados como un órgano en miniatura.

Figura 6 Diagrama simplificado del folículo piloso (Harkey, 1993)



El folículo piloso se puede dividir funcionalmente en tres zonas a lo largo de su eje: (Harkey, 1993)

a) La zona más interna. Se encuentra localizada alrededor del bulbo siendo el lugar donde se sintetizan las células del pelo.

b) Zona queratógena. Lugar de queratinización, localizada encima del bulbo, donde el pelo experimenta un fortalecimiento y solidificación.

c) Zona final. Es la región del pelo definitivo formada por células deshidratadas y cornificadas.

Después del nacimiento no se desarrolla ningún nuevo folículo (Muller, 1971). Por ello, el número de folículos que existen en el cuero cabelludo de un hombre adulto oscila entre 80.000 y 100.000, número éste que va disminuyendo con la edad (Barman, 1964).

Por otro lado, alrededor del folículo existen tres glándulas y una red de capilares relacionadas y asociados con él que son las siguientes:

- Glándulas sebáceas: sus conductos vacían en el folículo piloso por lo que el pelo que se está formando está bañado continuamente por las secreciones sebáceas antes de emerger de la piel.
- Glándulas apocrinas: En los humanos, estas glándulas están localizadas en la axila, párpados, región perineal y en el conducto auditivo externo, y vacían directamente en el folículo piloso.
- Glándulas sudoríparas: Están distribuidas por toda la superficie corporal y no están conectados con el folículo piloso.
- Red de capilares del folículo: Los folículos pilosos están rodeados por dos densas redes de capilares.

1.6.2 Fases de crecimiento del pelo

El pelo no crece continuamente, lo hace de forma de forma cíclica, alternando períodos de crecimiento y de reposo. En un pelo sano, el 80-90% de los folículos se encuentran en la fase anágena, un 10-18% en fase telógena y únicamente un 2% en fase catágena. Los ciclos de crecimiento del pelo son los siguientes:

- Fase anágena: Es una fase de crecimiento activo del pelo. El extremo del folículo es empujado más profundamente en la dermis como consecuencia de la continua división celular, formándose el pelo nuevo. Se piensa que los compuestos orgánicos y elementos trazas se incorporan al pelo en este momento de intensa actividad metabólica (Ryder, 1958).
- Fase catágena: Después de un período de crecimiento activo cuya duración depende del tipo de pelo, el folículo piloso entra en esta fase estacionaria. Durante este período de transición, las células detienen la división en la base y el pelo empieza a queratinizarse.
- Fase telógena: Tras el período de transición, el folículo piloso entra en un período de reposo, en el que el pelo detiene el crecimiento completamente y es retenido en la parte superior del canal folicular, de donde puede ser extraído fácilmente tirando.

El folículo entra en actividad, de nuevo, al final del período telógeno, de modo que se reconstruye la matriz y empieza a formar un nuevo pelo mientras los pelos viejos se desprenden ó mudan. De este modo, todos los pelos alcanzan una longitud terminal, que está determinada principalmente por la duración del período anágeno y parcialmente por la velocidad del crecimiento.

El conocimiento de la velocidad de crecimiento del pelo en un individuo es un dato esencial si se ha de establecer una relación entre un determinado segmento del pelo y el

período de tiempo de su formación en el folículo. El ciclo de crecimiento del pelo en humanos es asíncrono, por lo que el establecimiento de la velocidad exacta es muy difícil²⁸⁴.

Aunque la comunidad científica internacional ha estimado que el cabello crece aproximadamente 1 cm cada mes, este dato, sin ser incorrecto, es una sobresimplificación, dado que aparecen en la bibliografía diferentes autores que manifiestan cierta variabilidad al respecto, indicando que dicho crecimiento puede oscilar entre 0'45 mm/día para Chatt y col. (1988) y 1'12 mm/día para Giovanoli-Jakubcza y col., 1974.

1.6.3 Factores que influyen en los niveles de elementos traza en pelo

1.6.3.1 Tipo y localización del pelo

Considerando la zona anatómica se puede encontrar

- Pelo de la barba: Es grueso, los folículos son muy grandes y distintos de los del cuero cabelludo. En general, está menos contaminado por la secreción grasa. El crecimiento es algo más lento que el del cabello (aproximadamente 0'27 mm/día).
- Vello púbico y axilar: Tiene la ventaja de que se puede disponer de él incluso en los casos en que no es posible obtener muestras de cabello. Se encuentra menos o nada afectado por la contaminación externa y los tratamientos cosméticos. Sin embargo, su ratio de crecimiento es mucho menor y puede contaminarse a través de secreciones apocrinas
- Cabello: el cuero cabelludo es la región anatómicas más asequible y fácil de obtener. En él se distinguen cinco regiones: frontal, temporal, parietal, occipital y nuca. La más adecuada es la región occipital, dado que, el crecimiento del pelo se encuentra menos afectado por factores como la edad o el sexo y es, por tanto, más constante. Así mismo, en esta región el porcentaje de cabellos en fase anágena (85%) es más elevado.

1.6.3.2. Estructura y Composición

El pelo humano es una estructura muy compleja, en cuya composición intervienen componentes morfológicos y varias especies químicas.

Entre los componentes morfológicos del pelo se pueden citar los siguientes:

- **Cutícula:** Es la capa más externa del pelo. Su función consiste en el anclaje del pelo en el folículo, sirviendo al mismo tiempo como barrera protectora.
- **Córtex:** Es la zona intermedia del pelo, está rodeado por la cutícula y constituye la posición más gruesa del pelo. Las células corticales, presumiblemente, derivan de la parte más interna de la región de folículo piloso.
- **Médula:** Es la zona central y constituye el corazón del pelo. Se forma a partir de las células de la matriz al final de la papila. La presencia de la médula en el pelo puede ser constante, intermitente e incluso puede estar ausente, estando condicionada por el diámetro del pelo
- **Membrana celular:** En los pelos totalmente queratinizados, todas las células están envueltas por una membrana celular modificada que se forma a partir de la membrana plasmática original y está cimentada por material intercelular.

Con respecto a su composición química se pueden encontrar: proteínas (65 - 95%), agua (15 - 35%), lípidos (1 - 9%), minerales (0.25 - 0.95%) y melanina que experimenta grandes variaciones en función del color y del tipo de pelo.

El material lipídico del pelo proviene de las secreciones de las glándulas sebáceas y apocrinas y consiste en ácidos grasos libres, mono-, di-, y triglicéridos, ésteres de ceras, hidrocarburos y alcoholes. La mayor parte del contenido proteico del pelo es debido a la queratina.

Las cadenas polipeptídicas de la queratina y de todas las proteínas contienen en su estructura numerosos grupos funcionales donde se pueden unir los metales, como son los

grupos carboxilo, amino, hidroxilo y sulfhidrilo. El sitio exacto de la unión, así como los mecanismos o tipos de enlaces o uniones que tienen lugar no están totalmente dilucidados.

De igual manera, intervienen en su composición:

- Queratina: Es una sustancia proteica insoluble, que se forma en el folículo como producto final del proceso de queratinización.
- Melanina: La melanina (del griego “*melas*” negro) es el pigmento responsable del color del pelo, piel y ojos. Es un polímero compuesto básicamente por unidades de indol 5,6-quinona. Los gránulos de melanina se encuentran mayoritariamente en el córtex, también podemos encontrarlos en menor proporción en la médula y muy raramente en los espacios entre las células corticales.

1.6.3.3. Color

El color del pelo depende del número, tamaño y composición de sus gránulos de melanina, así como de su disposición y distribución en el pelo. De este modo, cuanto más oscuro sea el pelo, mayor contenido en melanina poseerá. Pese a que no existen evidencias científicas claras, durante algún tiempo se especuló con la mayor capacidad para que diferentes elementos se incorporen y fijen en el pelo cuando el contenido en melanina es elevado.

1.6.3.4. Mecanismo de incorporación al pelo

El mecanismo para la incorporación de los elementos traza al pelo consistente en la difusión pasiva desde la sangre a las células del pelo en crecimiento, situadas en la base del folículo, fue propuesto por Henderson (1993). Una red de capilares arteriales nutren el bulbo del pelo en crecimiento (raíz) a través de la papila, por lo que las moléculas liposolubles presentes en la sangre difunden a través de la papila y pasan al bulbo, donde se unen a las macromoléculas y quedan definitivamente incorporadas al pelo.

Este modelo también constituye la base científica sobre la que se apoya el análisis secuencial del pelo, en el que sucesivos y contiguos segmentos de pelo son analizados para obtener un perfil cronológico del elemento a valorar.

Por este motivo, la distancia desde la raíz es considerada correlativa con el tiempo de exposición.

1.7 Vulnerabilidad de la población infantil

1.7.1 Alteraciones del desarrollo neurológico en relación con el medio ambiente.

En la estrategia comunitaria de medioambiente y salud especialmente orientada a la infancia SCALE⁸⁶, se incluye como uno de los aspectos prioritarios los problemas de desarrollo neurológico. Así mismo, el Plan de Acción Europeo Salud de los Niños y Medio Ambiente (CEHAPE), identifica los trastornos neurológicos de la infancia como grupo de enfermedades a vigilar y fomenta el desarrollo de estrategias orientadas a la reducción de la incidencia de los factores medioambientales en la salud de los grupos más vulnerables (recién nacido, infancia y adolescencia).

En este mismo sentido, es conocido el hecho de que las sustancias químicas pueden alterar el desarrollo y funciones del sistema nervioso de manera específica y de forma permanente. Únicamente, algunas de ellas han sido ampliamente investigadas en sus efectos, mecanismos de toxicidad y comportamiento epidemiológico (plomo, mercurio, alcohol, nicotina, cocaína, opioides, algunos plaguicidas, algunos disolventes...), mientras que sobre la mayoría se ha efectuado una investigación mínima. De entre las más de 100.000 sustancias registradas en Europa, únicamente algunas de ellas, de muy alto volumen de producción y aquellas que han estado sujetas a normativas específicas han sido evaluadas de forma

sistemática con una batería completa de ensayos toxicológicos, y de entre éstas, una baja proporción han sido evaluadas con ensayos normalizados específicos de neurotoxicidad al desarrollo.

En España se dispone de muy pocos datos de estudios que valoren las alteraciones en el desarrollo neurológico y, menos aún, que valoren cuantitativamente la influencia de factores ambientales en esas alteraciones¹⁰⁴. Pese a ello, la extrapolación de los datos sugeridos por la OMS³²⁸ y estudios llevados a cabo en EEUU⁸⁰ se hace asumiendo que no existen razones que justifiquen que España sea sustancialmente diferente a otros países desarrollados, en cuanto a prevalencia de alteraciones neurológicas, ni en particular de alteraciones en el desarrollo. Esto se encuentra avalado por los datos de los indicadores generales de salud de la OMS para diferentes áreas del planeta.

En esta misma línea se ha observado que en los países occidentales el número de niños afectados por deficiencias del neurodesarrollo es importante y parece que se ha ido incrementando significativamente en los últimos tiempos. De hecho, se ha observado en las últimas décadas lo siguiente:

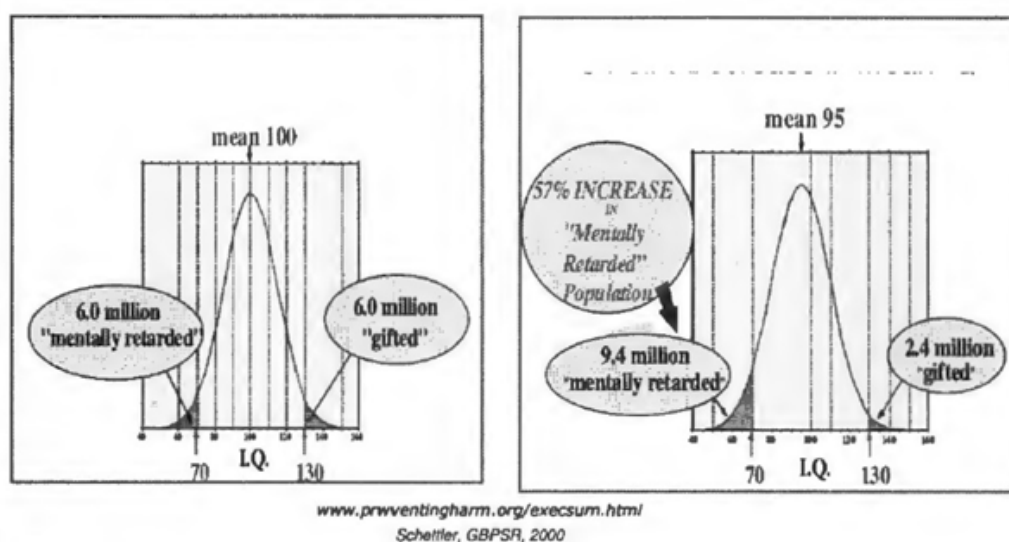
- Los problemas del aprendizaje pueden afectar entre un 5 y 10% de los niños escolarizados (American Psychiatric Association, 1994; Parril M, 1996)⁹⁹.
- Entre 1977 y 1994 los niños en programas de educación especial por problemas del aprendizaje aumentaron en casi un 200% (Kavale et al 1992)^{24,107,158}.
- El déficit de atención con hiperactividad afecta a un 3 a 6% de los niños en edad escolar. Otros datos sugieren que la prevalencia es mayor, pudiendo alcanzar el 17% (Goldman et al 1998)^{145,152}. En España los datos son escasos pero se sitúa en cifras del 4,7% (Cardo et al 2007).^{210,170}
- En EE UU la incidencia de autismo puede alcanzar a 2 de cada 1.000 niños en algunas zonas, y tiende a incrementarse. Asimismo, 1 de cada 150 niños hasta los 8 años es diagnosticado con un cuadro de espectro autista (Centers for Disease Control and Prevention CDC, 2007)^{31,114,278,315,322,332}.

- Cerca del 1% de todos los niños sufren algún tipo de retraso mental (American Psychiatric Association, 1994)^{36,105,173,174,339}.
- En Estados Unidos el grupo de enfermedades englobado en los denominados “Trastornos en el desarrollo y el aprendizaje” LDD^{14,2,3,213,222} “*Learning and developmental disabilities*” (autismo^{147,244}, desorden por déficit de atención e hiperactividad, signos de espectro autista, reducido CI...) afecta entre el 5 y el 20% de los niños (Landrigan et al, 2002)^{17,94,97,98}.

Estas cifras sugieren un problema de proporciones epidémicas. Por todo ello, se tiene cada vez más certeza de que complejas interacciones entre factores genéticos y ambientales tienen un papel extremadamente importante en el neurodesarrollo.

En este marco, es importante significar la importancia del neurodesarrollo, y para ello vale con subrayar que un desplazamiento en la curva de desarrollo cognitivo, tal como se muestra en la siguiente figura, podría aumentar peligrosamente, en órdenes de magnitud de millones, el número de individuos con un CI inferior a la normalidad. Este hecho, podría desencadenar en nuestra sociedad dramáticas consecuencias.³¹⁷

Figura 7 Desplazamiento de la curva de desarrollo cognitivo



1.7.2 Evidencias científicas

Es de sobra conocido que el desarrollo del sistema nervioso comienza en las primeras semanas de gestación y representa un proceso crítico en el desarrollo neurobiológico que puede verse alterado como consecuencia de la exposición a sustancias xenobióticas (naturales o fruto de la actividad industrial, agrícola...) ²¹⁰ durante la organogénesis e histogénesis cerebral. El resultado se puede expresar con lesiones y alteraciones funcionales detectadas en fases más tardías, incluso en la vida adulta. Señalar que hasta pequeñas modificaciones en la estructura y función del sistema nervioso podrían dar lugar a graves consecuencias

Asimismo, la exposición medioambiental comienza durante la gestación y, particularmente, en este momento, el sistema nervioso en desarrollo es especialmente vulnerable dada la inmadurez de la barrera hematoencefálica. Posteriormente, el recién nacido tiene un flujo cerebral mayor que el del adulto lo que puede implicar una mayor distribución y depósito de sustancias neurotóxicas.

Por otro lado, durante la infancia se han identificado causas que explican la especial vulnerabilidad a contaminantes ambientales: Inmadurez biológica, mayor consumo energético y metabólico, mayor absorción (el Pb es absorbido por los niños en un 40% mientras que en los adultos únicamente en un 10%) ^{188,237}, comportamiento social (espontaneidad para experimentar con su entorno), nula capacidad de decisión...

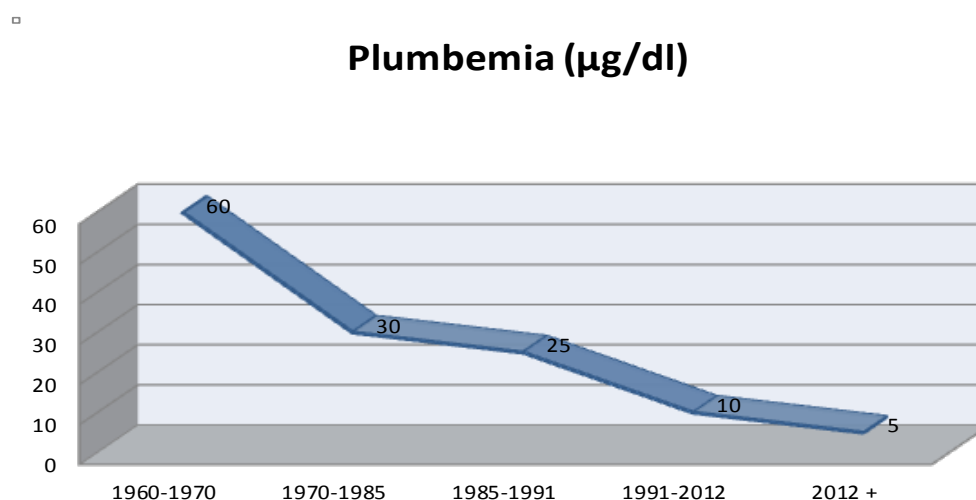
Finalmente, se muestran algunas de los efectos más conocidos producidos por elementos traza. Estos son los siguientes:

Plomo. Los efectos adversos ocasionados por la exposición fetal e infantil están asociados con disminución del CI, trastornos de atención y aprendizaje, hiperactividad, cambios de conducta. Además, desde los años 40 se sabía que la exposición que se ponía de manifiesto con niveles elevados de plomo en sangre durante la infancia podía producir bajo rendimiento escolar, disminución de la concentración y del aprendizaje, comportamiento

impulsivo... Desde entonces se han publicado efectos neurotóxicos ante niveles cada vez menores^{225,303,148}.

Los efectos del Pb sobre el desarrollo del SNC intrauterino influyen tanto sobre la estructura celular del cerebro como sobre la química neuronal. En los efectos estructurales se incluyen alteración en la proliferación celular, en la diferenciación, formación de sinapsis y apoptosis celular^{156,165,81}. Los efectos neuroquímicos incluyen niveles alterados de neurotransmisores (acetilcolina, dopamina, glutamato) y una densidad alterada del receptor de dopamina en distintas partes del cerebro. Por otro lado, se ha observado una mayor captación de Pb por el cerebro fetal que por el posnatal.

Figura 8 Disminución del umbral de seguridad del Pb en sangre establecido por el CDC



En esta misma línea, el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos “CDC” ha ido disminuyendo el umbral de seguridad del plomo en las últimas cuatro décadas, como se visualiza en la figura 8. Observando la tendencia lineal de los estándares de seguridad, es fácil comprender que no existe un umbral seguro de exposición al Pb en

niños^{157,196,283}. Máxime, teniendo en cuenta que la OMS en 2008 establecía que entre el 15-20% de los retrasos en el desarrollo cognitivo en los niños en los países en vías de desarrollo eran debidos a los niveles de Pb en el medio ambiente^{320,318,337}

Mercurio: Como se ha indicado anteriormente la exposición fetal e infantil a elevadas concentraciones de metilmercurio afecta al SNC inmaduro provocando retraso mental, trastornos motores y visuales ^{43,335,117}. Por otro lado, exposiciones incluso a niveles bajos de metilmercurio, originan también alteraciones en el sistema nervioso que afectan a los procesos del desarrollo feto/infantil (memoria, atención, aprendizaje...) ^{117,118,129,131,199} como se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios descritos en la bibliografía y llevados a cabo en diferentes partes del mundo^{32,137,197,198,287,288}.

Manganeso: La sobrexposición a Mn en las primeras etapas de la vida produce disminución en los niveles de los neurotransmisores dopamina, norepinefrina y serotonina.^{37,286}.

Por otro lado, Fe y Mn comparten el mismo sistema de transporte para su absorción intestinal. Aproximadamente, el 80% del Mn en el plasma está unido a la B1-globulina y albúmina, y una fracción más pequeña a la transferrina. El Mn atraviesa la barrera hematoencefálica por tres mecanismos: difusión facilitada, transporte activo y transporte dependiente de la transferrina.

La competición entre el Fe y el Mn por el mismo sistema transportador tiene implicaciones importantes por el potencial incremento de la acumulación en el SNC de Mn en las poblaciones con deficiencia de hierro^{248,58}. En nuestro planeta, más de 2.000 millones de personas, sobre todo niños y mujeres embarazadas y/o en edad fértil, manifiestan anemia ferropénica tras absorción inadecuada de Fe. Los efectos potenciales asociados a la acumulación en el SNC del Mn en estas poblaciones representan un reto sanitario de gran magnitud pendiente de evaluación.^{148,182,243}

Asimismo, se ha observado en numerosos estudios en la población infantil una relación entre la concentración de Mn en el cabello y el trastorno de déficit de atención e hiperactividad. Incluso se han descrito en la literatura científica estudios de consumo elevado de Mn en el agua, de forma crónica, observándose como afectaba al rendimiento

escolar.^{35,76,319,336} (En USA aproximadamente un 6% de los pozos exceden los límites establecidos por la EPA para el Mn en agua de bebida)

Cadmio: El Cd es tóxico para el SNC fetal e infantil. Durante el embarazo, interfiere con la función placentaria, altera diversas enzimas y modifica la disponibilidad de nutrientes y elementos esenciales para el SNC. La exposición neonatal altera los niveles de neurotransmisores, como la nor-epinefrina, dopamina, serotonina y acetilcolina^{164,315}. La exposición al Cd también está asociada con una producción incrementada de radicales libres en tejidos, lo que provoca daños en la membrana celular y cambios en una variedad de otras funciones fisiológicas.

Diversos estudios han examinado las consecuencias neurológicas de la exposición precoz al Cd^{173,337}. Pero la superposición habitual de las exposiciones a Pb y Cd dificulta la contribución relativa de cada metal sobre los efectos observados³⁴⁰. En niños, se ha demostrado una correlación significativa entre los niveles elevados de Cd y Pb en el cabello con hiperactividad, disminución del desarrollo verbal y menor coeficiente de inteligencia. Además, probablemente, el Pb y el Cd, afectan distintos aspectos de la inteligencia^{337,340,322}.

Arsénico: La exposición prenatal a Arsénico causa apoptosis y necrosis de las neuronas fetales (Chattopadhyay et al., 2002). Recientes estudios epidemiológicos sugieren que la exposición a As puede producir déficit neurocognitivo en niños^{10,38,337}. En este sentido, en un estudio realizado en población adolescente de Taiwan, residiendo en un área con altos niveles de As en el agua, se observaban bajas puntuaciones en diferentes test de atención y memoria (Tsai et al., 2003). De igual manera, Wasserman et al. (2004)³¹⁸ habían observado una fuerte asociación entre niveles de As en agua elevados y disminución en la puntuación del CI.

Objetivos

2. Objetivos

Es cada vez mayor la certeza y unanimidad que existe en la comunidad científica acerca de la importancia que, factores genéticos y ambientales, tienen en el neurodesarrollo humano, a través de complejas interacciones no del todo bien conocidas⁶⁸.

Paralelo a lo anterior avanza la preocupación sobre las graves consecuencias que implican los trastornos en el desarrollo y el aprendizaje en la población infantil así como el impacto de carácter sistémico que éstos pueden llegar a suponer en nuestra sociedad, convirtiéndose en un problema de proporciones epidémicas^{301,302}; lo que hace que sea evidentemente necesario y prioritario proteger a los grupos más vulnerables: recién nacidos, infancia y adolescencia.

Los miembros de estos grupos, recién nacidos, infancia y adolescencia, son los más vulnerables tanto a las deficiencias de elementos nutricionales, como a la influencia de elementos tóxicos; pues por un lado respiran más rápido y poseen una superficie pulmonar mayor en relación a su peso y por otro están todavía creciendo y sus mecanismos de detoxificación no se encuentran totalmente desarrollados.

A su vez, uno de los vectores de transmisión más ampliamente documentado de los elementos tóxicos posibles causantes de los tipos de trastornos antes citados, son los alimentos que ingerimos

En este sentido, es el pescado un elemento destacado en la dieta Mediterránea.^{194,255} Y consecuencia de ello, España cuenta con una elevada tasa consumo de pescado, por persona y día (70g/persona en 2002) (Martin 2002)¹⁷⁸, situada, esta cifra, muy por encima del promedio de la Unión Europea (10 g/persona en los Países Bajos a 80 g/persona en Noruega.)(EFSA 2004)^{92,74}.

Lo anterior parece favorecer la incorporación a nuestro organismo de cantidades significativas de mercurio a través de la ingesta de grandes predadores marinos, que, debido a su longevidad y voracidad, lo han ido acumulando a lo largo del tiempo en sus organismos en cantidades mucho mayores a las inicialmente esperadas.

Todo ello, junto al hecho que el mayor consumo por Kg de peso se da en los niños ^{64,211,250}, pudiera ser causa de que muchos de los niños españoles ingieran una cantidad de MeHg que supera los límites de Seguridad recomendados por la EPA ^{80,203} y por la JECFA (FAO/OMS)^{74,146}

Merece la pena destacar que durante todo el período infanto-juvenil cualquier desviación asociada con el desarrollo individual de los niños tiene consecuencias negativas que se ponen de manifiesto de muy diversas formas.

Por este motivo, resulta de vital importancia, establecer unos valores de referencia de elementos traza tanto a nivel infantil como juvenil a fin de evidenciar cualquier pequeña alteración en el desarrollo junto con deficiencias de elementos nutricionales e influencia de elementos tóxicos

Pese a ello en la actualidad los parámetros de referencia disponibles para la identificación de este tipo de elementos se refieren únicamente a una población adulta⁷¹, lo que provoca la necesidad del establecimiento de los mismos (en muestra de pelo) de población infantil que ayuden a valorar su estatus nutricional así como el grado de exposición a determinadas elementos tóxicos.

Asimismo el pelo, es el biomarcador preferido para evaluar la exposición a Hg en periodos largos de tiempo. (NRC 2000)²⁰³, además de ser un adecuado biomarcador para determinar el estatus nutricional y exposición medioambiental

Sobre lo anteriormente expuesto, y tratando de establecer objetivos que, como decían los clásicos, fueran “definidos, decisivos y alcanzables” se ha proyectado este estudio a fin de lograr cuatro objetivos, diferentes, pero interrelacionados entre sí, que se estima pueden aportar valor al conocimiento científico actual, llenando alguno de los infinitos huecos que aún persisten, a la vez que se espera puedan servir como un peldaño más en la larga escalera que aún queda por ascender, con el fin de identificar los problemas que para los humanos genera la contaminación que nosotros mismos producimos en nuestro medio ambiente y ser capaces, a partir de ese conocimiento, de ponerles solución.

Así se establecieron para este proyecto de investigación, los siguientes objetivos:

1. Conocer los valores de referencia de elementos traza en pelo de la población infanto-juvenil de la Comunidad de Madrid
2. Comparar los valores de referencia de esa población, con los de otros estudios tanto nacionales como internacionales.
3. Investigar el contenido de MeHg en el pelo de ésta población y compararla con los datos de referencia de las regulaciones internacionales.
4. Evaluar e identificar en su caso, la posible asociación de los niveles de Hg en pelo y el consumo de pescado.

Material y métodos

3. Material y métodos

3.1 Diseño del estudio

Estudio observacional descriptivo transversal

3.2 Población de estudio

La población de la Comunidad de Madrid según el padrón municipal de 2009 era de 6.386.000. En ésta, la población infantil/juvenil menor de 18 años era aproximadamente de 1.255.000. En este estudio han participado 648 niños/adolescentes de esta comunidad.

3.3 Cálculo del tamaño muestral

Se calcula el tamaño muestral del estudio de valores de referencia de elementos traza para un nivel de confianza del 95% (error α del 5%), una precisión (error β de ± 0.2) en un contraste bilateral y en base a los datos de la bibliografía se aplica una desviación estándar estimada de 2. De esto, se deduce que se precisa una muestra aleatoria poblacional de 385 sujetos. Asimismo, se ha estimado una tasa de reposición del 0%.

El obtener una muestra inicial con un número de individuos muy superior al tamaño muestral calculado hace que se puedan realizar estimaciones con un alto grado de fiabilidad, a la vez que nos permite establecer relaciones entre variables que de otra forma estarían limitadas por el escaso tamaño de muestra

3.4 Criterios de inclusión

Se han incluido en el estudio todos aquellos niños que perteneciendo a alguno de los tres colegios seleccionados, voluntariamente, han querido participar en el mismo y han contado con el consentimiento/autorización de sus padres y/o tutores (anexo I). Inicialmente, se consideró que el pelo teñido sería un criterio de exclusión. Finalmente, no se encontró ninguna muestra con esas condiciones.

3.5 Selección de la muestra

La selección de la muestra se llevo a cabo de forma consecutiva no probabilística a partir de 3 colegios elegidos de entre aquellos que habían respondido afirmativamente a nuestra solicitud de petición (anexo III) en la Comunidad de Madrid. Dos de ellos localizados en Madrid capital, uno en la zona norte y otro en la zona sur y el tercero en un pueblo de la periferia de la zona norte de Madrid.

Estos colegios se encontraban situados en áreas de un nivel socioeconómico medio-alto, con muy escasa presencia de población inmigrante, lo que ha evitado la introducción de la variable étnica; asimismo la pertenencia a ese estrato social permite aventurar la inexistencia de problemas endémicos de malnutrición o de enfermedades asociadas a entornos marginales que pudieran distorsionar de algún modo los resultados de este estudio.


3.6 Período de estudio


El estudio abarcó el período comprendido entre abril de 2008 a diciembre de 2009. Para el estudio, se elaboró un cuestionario de frecuencia de consumo de pescado semanal, en el que se solicitaban además otras variables: edad, sexo, peso, talla y posibles patologías.


Entre febrero y abril de 2008 se enviaron las cartas solicitando participación en el estudio. Una vez recibidas las contestaciones, se seleccionaron los colegios y se realizaron los trabajos de preparación. Paralelamente, se planificaron las citas para la recolección de muestras y se procedió a la administración de cuestionarios junto con las hojas de consentimiento informado.


3.7 Variables


- *Variables dependientes:* Continuas


 Concentración de Al en pelo ($\mu\text{g/g}$)


 Concentración de Fe en pelo ($\mu\text{g/g}$)













 Concentración de Se en pelo ($\mu\text{g/g}$)

 Concentración de Sr en pelo ($\mu\text{g/g}$)


 Concentración de Zn en pelo ($\mu\text{g/g}$)

 Concentración de Bi en pelo ($\mu\text{g/g}$)

 Concentración de Co en pelo (ng/g)

-  Concentración de Ni en pelo ($\mu\text{g/g}$)
-  Concentración de Mn en pelo (ng/g)
-  Concentración de Ag en pelo (ng/g)
-  Concentración de Mo en pelo ($\mu\text{g/g}$)
-  Concentración de Cd en pelo (ng/g)
-  Concentración de As en pelo ($\mu\text{g/g}$)
-  Concentración de Cr en pelo ($\mu\text{g/g}$)
-  Concentración de Cu en pelo ($\mu\text{g/g}$)
-  Concentración de Ba en pelo ($\mu\text{g/g}$)
-  Concentración de Hg en pelo ($\mu\text{g/g}$)
-  Concentración de Tl en pelo (ng/g)
-  Concentración de Pb en pelo ($\mu\text{g/g}$)

- Variables independientes:

-  Variables sociodemográficas: sexo, edad, peso y talla
 - Dicotómicas: sexo
 - Cuantitativas: peso, talla
 - Politómica: edad

En el cuestionario la variable edad se inscribe como fecha de nacimiento. Es categorizada inicialmente en 5 grupos, posteriormente y debido a las limitaciones que pudieran surgir al emplear un grupo de menores de un año con únicamente 7 individuos se decide unificar este grupo con el de 1-5 años. Pasando a denominarse el nuevo grupo de 0-5 años.

Inicialmente eran considerados: Menores de 1 año, entre 1 y 5 años, entre 6 y 10 años, entre 11 y 15 años y mayores de 15 años.

Finalmente quedan 4 grupos de la siguiente manera: Entre 0 y 5 años, entre 6 y 10 años, entre 11 y 15 años y mayores de 15 años.



Hábitos de vida: frecuencia de consumo de pescado

- Politómica: frecuencia de consumo de pescado

Para el tratamiento de los datos, la variable frecuencia de consumo de pescado se dividió en las siguientes categorías: no consumidores, consumidores de una o dos veces por semana, consumidores de tres o cuatro veces por semana y consumidores de más de cuatro veces. Este cuestionario de frecuencia de consumo de pescado fue elegido tras haber sido utilizado y validado previamente por López Colón en 2003, en la elaboración de su tesis doctoral. En este sentido, se ha confirmado que ha sido ampliamente empleado en la bibliografía, tanto en estudios nacionales como internacionales^{64,65,148}



Estado de salud:

Se incluyó esta variable a fin de conocer la salud de los niños a estudio. De esta manera, se podrían utilizar los datos obtenidos, para excluir a alguno de los participantes, por la patología que presentarían o la medicación que tomarían...



Presencia de Amalgamas dentales

Las amalgamas dentales están compuestas por un 40-50% de mercurio, un 25% de plata y en un 25-35% por una mezcla de cobre, zinc y estaño. Se estudió la liberación de mercurio de empastes de amalgama y se llegó a la conclusión de que las superficies de las amalgamas

liberan vapores de mercurio en la boca³⁰⁶. La respiración por la boca transporta el vapor de mercurio a los alvéolos del pulmón donde el 80% del vapor inhalado pasa a la circulación sanguínea. Parte del mercurio elemental procedente de las amalgamas se oxida a mercurio divalente y pasa con la saliva al tracto gastrointestinal dónde se absorbe un máximo de un 20%^{53,54}

Dependiendo del número de empastes de amalgama, se estima que la absorción diaria promedio de mercurio elemental proveniente de empastes dentales varía entre 3 y 17 µg de mercurio.⁸

Sin embargo, en nuestro estudio, teniendo en cuenta que en la muestra de cabello el mercurio que aparece es fundamentalmente Hg orgánico (80-90%) y considerando la dificultad de que en los niños aparezcan amalgamas dentales, no se consideró oportuno, finalmente, utilizar esta variable.

3.8 Recogida de datos

Se contactó directamente con cada uno de los niños y para su inclusión en el estudio los padres y/o responsables dieron su autorización mediante consentimiento informado (Anexo I). A los participantes se les administró el cuestionario donde se recogían los datos de las variables introducidas previamente (Anexo II). El número de participantes fue de 648, agrupados en cuatro categorías: de 0 a 5, de 6 a 10, de 11 a 15 y mayores de 15 años.

El cuestionario elegido fue una modificación del empleado y validado por López Colón en 2003 en la realización de su tesis doctoral.

3.9 Consideraciones éticas

Se solicitó la firma del consentimiento informado previo a la realización del estudio por parte de los padres o tutores de los niños (Anexo I). Asimismo, se respetaron las normas internacionales de protección de datos, así como la legislación española vigente (Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal, BOE 298 de 14/12/99).

3.10 Valores de referencia

Para la obtención de los valores de referencia de los diferentes parámetros en muestras de cabello y teniendo en cuenta que se trata de distribuciones que no cumplen la normalidad, se han seguido, con ligeras modificaciones, las directrices de la IFCC que hizo suyas la IUPAC^{142,263} en 1997, dado que, al mismo tiempo, estas directrices han sido asumidas, en los grandes estudios de biomonitorización humana que se llevan a cabo periódicamente tanto en Europa (Alemania y República Checa)^{27,28,126,262} como en América del norte (EEUU y Canadá). Así, con la finalidad de poder comparar nuestros valores guía con los establecidos en los diferentes estudios de biomonitorización internacionalmente reconocidos (GERES, NHANES, CHMS...) ²⁰⁵ se han seleccionado los percentiles 5 y 95 de nuestra población a fin de obtener dichos intervalos de referencia.

3.11 Metodología

3.11.1 Recolección de muestras (cabello)

Para el ensayo fue requerido un mínimo de 5-10 mg de pelo (La mayor parte de los métodos requieren al menos un mg). La recolección se realizó cortando de la región occipital, lo más cercano a la raíz, un mechón de cabello del diámetro aproximado de un lápiz. Cada muestra se introdujo en un envase aséptico de polietileno, dejando claramente diferenciada la parte distal y la proximal mediante el empleo de una marca realizada con rotulador indeleble. Posteriormente se envió al laboratorio y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su análisis^{150,155}.

3.11.2 Análisis de muestras

Las muestras fueron pretratadas siguiendo las recomendaciones de la IAEA (*International Atomic Energy Agency, Viena*)³⁴² con un lavado previo con una solución de acetona y lavado posterior realizado dos veces, con agua MiliQ a fin de evitar posibles contaminaciones exógenas (agua, aceite, polvo...). Seguidamente fueron sometidas a un proceso de digestión ácida con una mezcla de sulfúrico y nítrico (30:70) o bien únicamente con nítrico y digeridas en estufa a ($60^{\circ} \pm 5^{\circ}$) por un período de 16 horas.

3.11.3 Técnicas Analíticas

Las metodologías empleadas han sido Espectroscopía de Absorción Atómica por vapor frío (*Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry*) para la determinación de Hg y Plasma Acoplado Inductivamente con Espectrometría de Masas ICP-MS para el resto de los elementos^{166,192,270}.

Los dos equipos utilizados eran de la casa comercial Perkin Elmer modelos FIMS 400 y ELAN 6100 DRC

3.11.3.1 Técnicas de plasma

Benito del Castillo, en 1998, define un plasma como “un gas fuertemente ionizado, eléctricamente neutro pero conductor de la corriente, formado por un conjunto de electrones, iones cargados positivamente y átomos y/o moléculas”⁶². Se considera al plasma como el cuarto estado de agregación de la materia. Los plasmas pueden estar parcialmente o totalmente ionizados. Gran parte del universo se encuentra en estado de plasma, por ejemplo la corona solar, espacios interestelares, etc.⁶²

Un plasma se puede establecer en el laboratorio mediante una descarga eléctrica entre dos electrodos situados en un tubo en cuyo interior exista un gas fácilmente ionizable a baja presión (gas plasmógeno). La ionización en el seno del plasma se mantendrá por los continuos choques de los electrones, procedentes de la descarga, con los átomos e iones formados.

Teniendo en cuenta las temperaturas que se alcanzan en los plasmas, la energía desprendida va a ser empleada para la excitación de átomos, incrementando el número de elementos del sistema periódico capaces de ser excitados y, por lo tanto, analizados cualitativamente y cuantitativamente.^{62,230}.

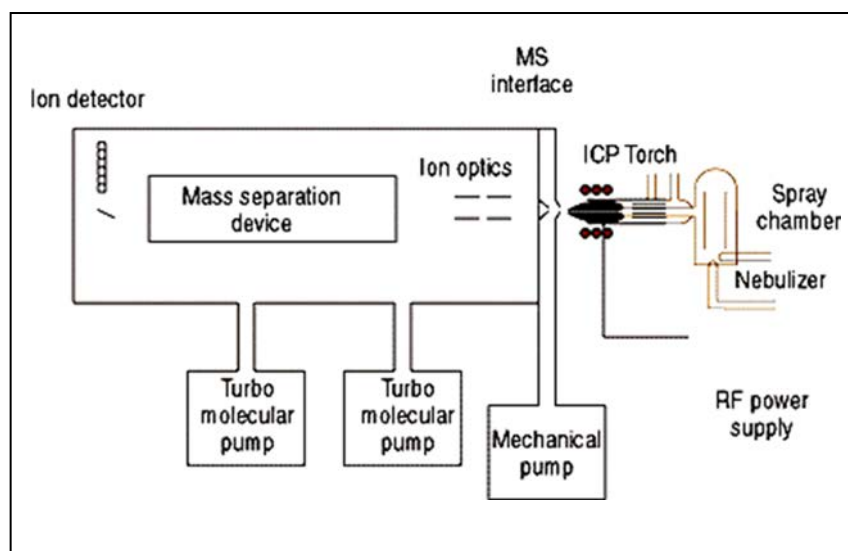
Existen varios tipos de plasmas aunque con diferente utilidad analítica. Los más difundidos son:

- DCP Plasma eléctrico de corriente continua
- ICP Plasma de acoplamiento inductivo
- CCP Plasma de acoplamiento inductivo
- MIP Plasma de acoplamiento inductivo de microondas
- CMP Plasma de acoplamiento capacitativo de microondas

3.11.3.2 Plasma acoplado inductivamente ICP-MS

Esquemáticamente, un ICP-MS se compone de un nebulizador, una cámara de nebulización “*spray chamber*”, una antorcha, una zona de interfase “*interface*”, un sistema separador de masas y el detector.²⁸⁹

Figura 9 Esquema de un ICP-MS. (Spectroscopy, Thomas, 2001).



Sin embargo, es diferente la extracción y el transporte de los aniones que la de los cationes, por lo que la mayoría de los equipos instrumentales no están diseñados para la determinación de aniones.

La muestra debe estar en estado líquido, siendo bombeada a 1mL/min (generalmente con una bomba peristáltica) en el nebulizador, donde se produce un fino aerosol por medio de argón.²⁹⁰ Las muestras biológicas son mezcladas con soluciones ácidas o básicas, que mantienen los elementos traza en solución, y un detergente que mantiene constante el flujo de líquido al nebulizador al formar una suspensión más estable ⁴⁶ aunque la utilización de una bomba peristáltica asegura un flujo constante de muestra independientemente de la viscosidad de la misma. Las finas gotas del aerosol, que representan el 1 ó 2 % de la muestra, son separadas de las gotas de mayor tamaño en la cámara de nebulización “*spray chamber*” ²⁹⁰ en función de su peso por simple gravedad, llegando a la antorcha sólo un 1% del aerosol previamente formado. Además, la cámara de nebulización, minimiza la entrada por impulsos provocada por la bomba peristáltica. El aerosol atraviesa la antorcha donde se ioniza la muestra, para después ser dirigidos al sistema separador de masas por medio de una zona de interfase “*interface region*” que se encuentra a 1 o 2 torr de presión gracias a una bomba mecánica ²⁹⁰ La región “*interface*” consiste en dos conos metálicos llamados el “*sampler*” y el “*skimmer*”. Cada uno de ellos posee un orificio de 0,6 a 1,2 mm que permiten el paso de los iones a través de una óptica iónica “*ion optics*”, donde son guiados dentro del sistema separador de masas. ²⁹² La función de estos conos es la de aislar los gases de la parte central del plasma para enriquecerla de iones. Para reducir el efecto de la alta temperatura del plasma sobre esta zona, es refrigerada con agua.²⁹²

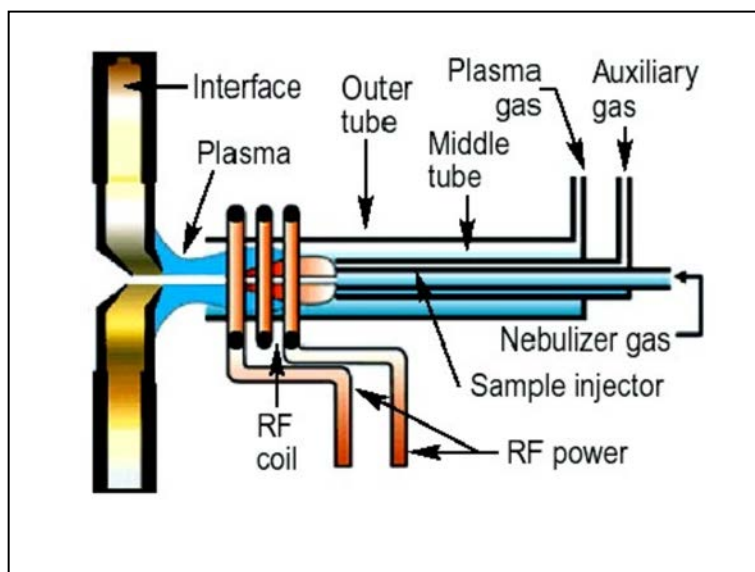
Cuando la muestra, a gran velocidad, entra en el plasma pasa a través de distintos estados físicos desde la zona de precalentamiento hasta la zona de radiación antes de que se ionice en la zona analítica.²⁹¹ La muestra, a medida que va atravesando diferentes zonas del plasma, es desecada, vaporizada, atomizada e ionizada ¹²⁵

Los nebulizadores diseñados para la ICP-OES no son recomendados para la ICP-MS debido al escaso diámetro de los conos “*sampler*” y “*skimmer*” que obligan a que en el aerosol generado no haya más de un 0,2% de sólidos. ²⁹⁰

La muestra se introduce dentro del plasma caliente por el extremo superior de los tubos mediante un flujo de argón de 0,3 a 1,5 L/min a través del tubo de cuarzo central. La muestra puede ser un aerosol, un vapor, generado térmicamente o por una chispa, o un polvo fino. El dispositivo que más se utiliza para la inyección de la muestra tiene una construcción semejante a la de los nebulizadores que se emplean en los métodos de llama. En el caso de introducirse un vapor, se utiliza el mismo tipo de hornos utilizados en la ETAAS pero que sólo se utilizan para la pirólisis y vaporización de la muestra y no la atomización ²⁷²

Una fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP) o antorcha, consiste en tres tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluye una corriente de argón con un caudal comprendido entre 11 y 17 L/min ²⁷² que tiene tres funciones: transportar la muestra problema, actuar como gas plasmógeno y como gas refrigerante. El diámetro del tubo más grande es de aproximadamente 2,5 cm. El gas utilizado para formar el plasma, generalmente argón, circula entre el tubo exterior y el medio con una velocidad de flujo de 12 a 17 L/min. La antorcha de los ICP-MS, algo diferente a la utilizada en ICP-OES, se monta horizontalmente y colocada centrada en la bobina de radiofrecuencias ²⁹¹

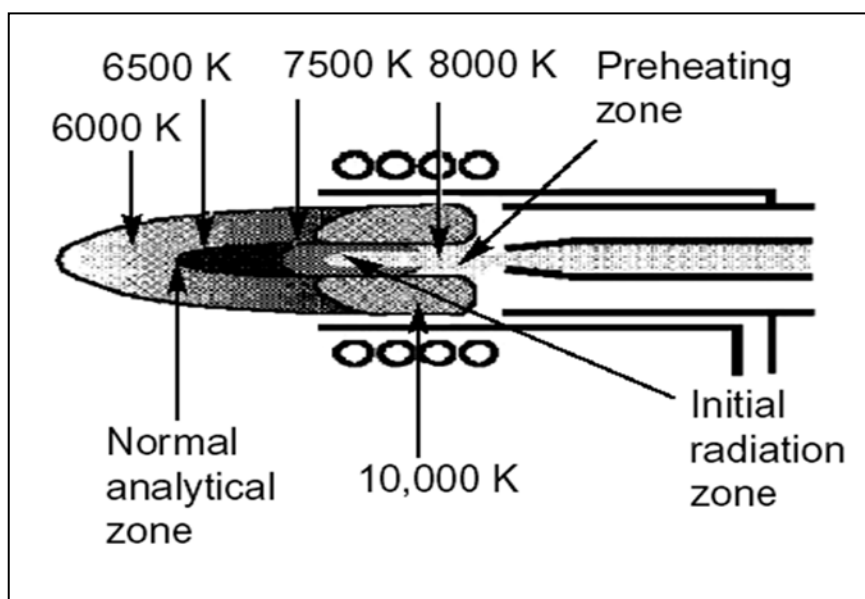
Figura 10 Vista detallada de la antorcha (Spectroscopy).



El gas auxiliar, utilizado para cambiar la posición de la base del plasma, se introduce entre el tubo medio y el central con una velocidad de flujo de aproximadamente 1 L/min. Un tercer gas, utilizado para transportar la muestra, se introduce por el interior del tubo central a una velocidad de aproximadamente 1 L/min. Cuando la muestra es muy corrosiva, se utiliza un tubo interior o tubo inyector de alúmina, platino o zafiro. Aunque el argón es el gas más adecuado para los tres flujos, existen ventajas analíticas en la utilización de mezclas de gases, principalmente en el nebulizador.¹⁵⁴

La ionización del argón hace que los iones resultantes y sus electrones asociados interaccionan con el campo magnético oscilante que se produce por la bobina de inducción. Esta interacción hace que los iones y los electrones dentro de la bobina se muevan en trayectorias anulares cerradas. El calentamiento óhmico es una consecuencia de la resistencia a este movimiento. La temperatura del plasma así formado es suficientemente elevada como para hacer necesario el aislamiento térmico del cilindro externo de cuarzo. Para lograr este aislamiento se hace fluir argón en forma tangencial alrededor de las paredes del tubo.²⁷²

Figura 11 Diferentes zonas de temperatura en el plasma (Spectroscopy).



Cuando el campo de radiofrecuencias, normalmente de 750 a 1500W (dependiendo de la muestra), es aplicado a la bobina, una corriente alterna oscila en la bobina a una frecuencia igual a la del generador que, en la mayor parte de los equipos es de 27 MHz o 40 MHz. Esta oscilación de la corriente genera un intenso campo magnético en la punta de la antorcha. Se aplica una chispa de alto voltaje cuando fluye el argón para iniciar la ionización. Los electrones liberados son acelerados por el campo magnético provocando la ionización de otros átomos en una reacción en cadena, formando lo que se conoce con el nombre de descarga de plasma acoplado inductivamente.

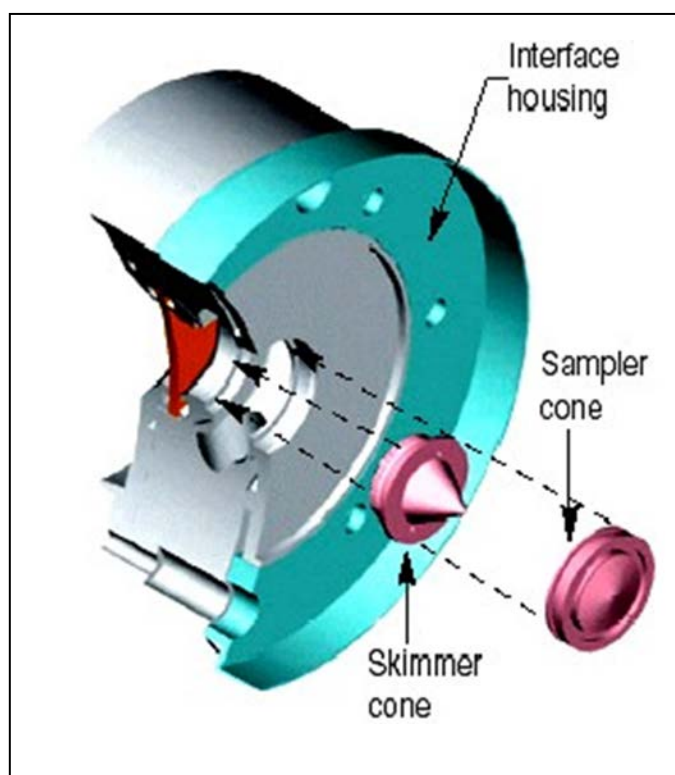
La antorcha del plasma juega un papel diferente en la técnica ICP-MS respecto a la de ICP- OES. En ambas técnicas se produce el plasma por interacción de un intenso campo magnético, producido por una radiofrecuencia pasando a través de una espiral (o bobina de cobre), en un flujo tangencial de gas a través de un tubo de cuarzo concéntrico (antorcha). En la técnica ICP-OES el plasma, generalmente orientado verticalmente, se utiliza para generar una emisión de radiación electromagnética provocada por el paso de los átomos en estado excitado a su estado fundamental. En la técnica ICP-MS, el plasma orientado horizontalmente se utiliza para producir iones cargados positivamente más que una emisión de radiación electromagnética. De hecho, se procura que la emisión de luz no alcance al detector porque incrementarían el ruido instrumental ²⁹²

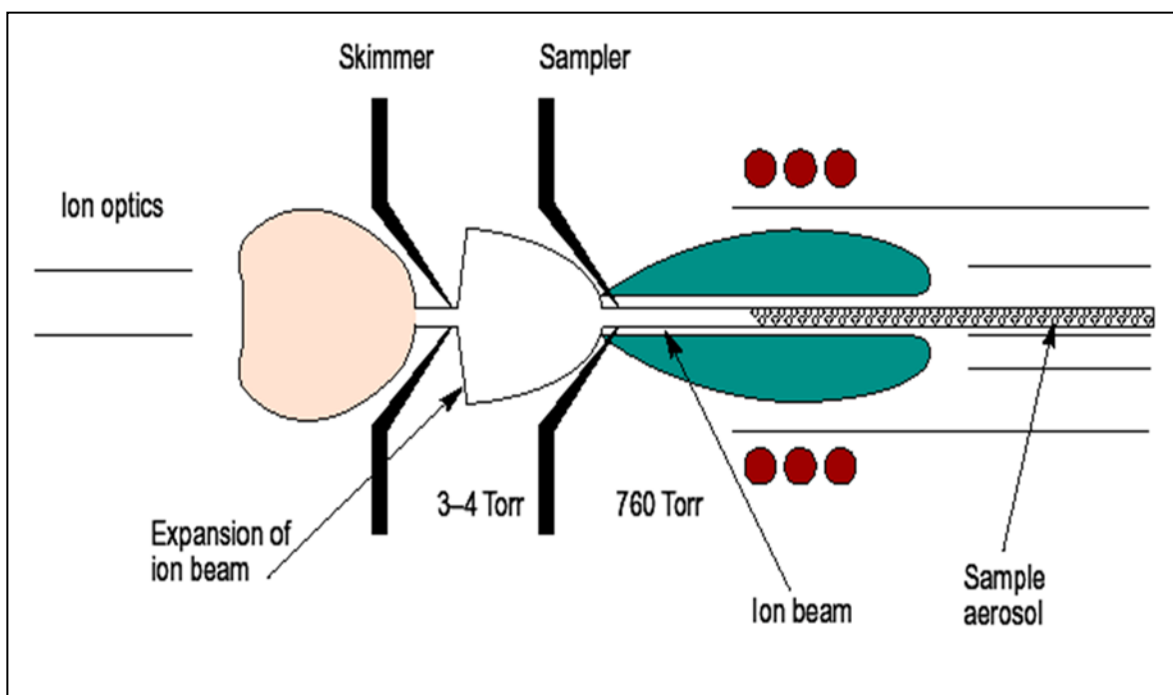
Rodeando la parte superior de este tubo se encuentra una bobina de inducción refrigerada, antiguamente por agua y más recientemente por el mismo, alimentada por un generador de radiofrecuencias capaz de producir una potencia de 2kW a unos 27MHz (de 700 a 1500W). ³⁴

La zona de interfase es una de las zonas más críticas en un espectrómetro de masas de ICP. Su función es ayudar a los iones a ser eficazmente transportados desde el plasma, a 760 torr, a la región del sistema separador de masas, a 10⁻⁶ torr. Desafortunadamente, hay un acoplamiento capacitativo "*capacitative coupling*" entre la bobina de radiofrecuencias y el plasma que provoca una diferencia de potencial de unos pocos cientos de voltios. Si ésta no fuera eliminada aparecería una descarga eléctrica entre el plasma y el cono "*sampler*". Esta descarga aumenta la formación de especies interferentes, incluyendo especies doblemente cargadas, y

afecta dramáticamente a la energía cinética de los iones que entran en el espectrómetro de masas, haciendo errática e impredecible la optimización de la óptica iónica "*ion optics*". Por esta razón, la carga secundaria debe ser eliminada por medio de alguna clase de toma de tierra de la bobina de radiofrecuencias ²⁹²

Figura 12 Vista de la zona de interfase (Spectroscopy).





Cuando salen los iones de la zona de interfase son dirigidos dentro de una cámara de vacío por medio de una serie de lentes electrostáticas que se denomina óptica iónica (“ion optics”)²¹⁸. El vacío se consigue mediante un sistema de bombas de vacío en cascada que incluye bombas mecánicas, que inician el proceso, y unas bombas turbomoleculares que lo mantienen.⁴⁶ En esta zona, una bomba turbomolecular mantiene un vacío de 10-2 torr. Las lentes electrostáticas tienen la función de dirigir los iones hacia el sistema separador de masas impidiendo el paso de fotones, partículas y especies neutras que contribuirían a aumentar los niveles de ruido de fondo e inestabilizar la señal²⁹⁴.

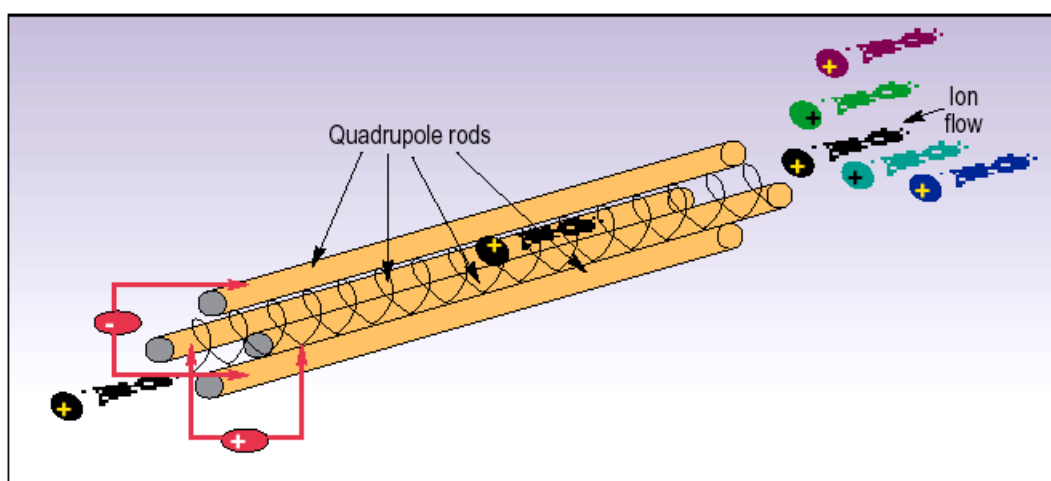
Los espectros de masas se obtienen por conversión de los componentes de una muestra de iones gaseosos que se mueven rápidamente y se separan en función de su relación masa-carga.²⁷¹ Los espectrómetros de masas discriminan entre la masa de los isótopos.

Durante el proceso de la espectrometría de masas todos los factores permanecen constantes, por lo que la trayectoria de la partícula depende de la relación masa y carga³¹²

En el sistema separador se someten a la acción de un potente campo magnético dentro de un vacío elevado para evitar los choques entre fragmentos³¹².

Desarrollados en el inicio de los años 80, los analizadores de masas de cuadrupolo constituyen en la actualidad el 90% de los separadores de masas de los ICP-MS. ²⁹⁵ El analizador cuadrupolar se caracteriza por no requerir la presencia de un campo magnético estático. Los iones acelerados inciden en dirección del eje central de un conjunto de cuatro varillas metálicas rectas y paralelas entre ellas, conectadas diagonalmente, dos a dos, a los polos de una fuente de potencial de corriente continua y a un oscilador de radiofrecuencias. La selección de masas se obtiene manteniendo fija la frecuencia de la radiofrecuencia y variando los potenciales de la corriente continua y de la radiofrecuencia. Según se observa en la figura 13, de los diferentes iones que llegan al cuadrupolo, cuando se aplica un determinado voltaje, sólo aquellos que tienen una relación carga masa concreta permanecen en una trayectoria helicoidal en el interior del cuadrupolo, mientras que el resto atravesarán los espacios existentes entre las barras del cuadrupolo y serán evacuados del mismo. ²⁹⁵

Figura 13 Representación esquemática de la acción de un separador de masas de cuadrupolo (Spectroscopy).

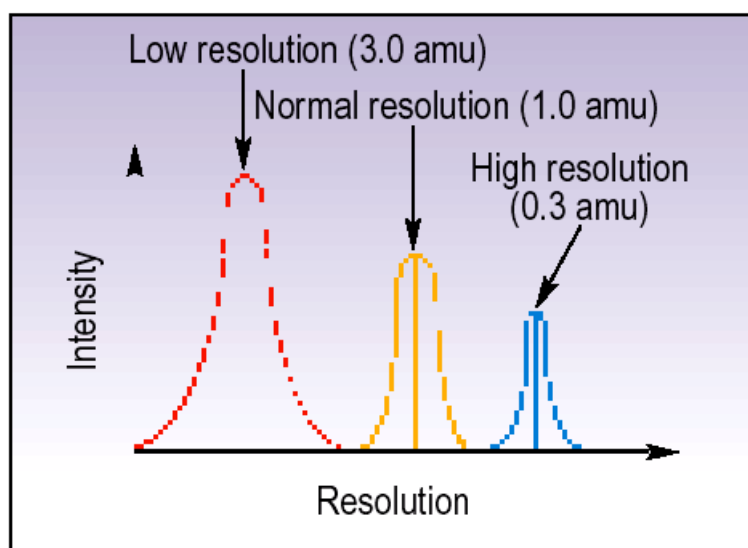


La utilidad analítica de un espectrómetro de masas depende de la llamada resolución del instrumento, o capacidad del mismo para separar dos partículas de diferente masa ³¹². La resolución de un separador de masas de cuadrupolo depende de una combinación de factores que incluye la forma, diámetro y longitud de las barras, frecuencia de la fuente de alimentación, el vacío de trabajo, los voltajes aplicados y la energía cinética de los iones que entran en el mismo afectando a la estabilidad de los iones en el trayecto interior del cuadrupolo. En teoría, la resolución de un separador de masas de cuadrupolo varía entre 0,3 y 3,0 UMA, sin embargo, una mejor resolución conlleva una pérdida de sensibilidad, como se observa en la figura 14, en la que se compraran las resoluciones de 3,0; 1,0 y 0,3 analizando la misma masa²⁹⁵.

Los analizadores de tiempo de vuelo tampoco requieren campo magnético. A diferencia de todos los citados anteriormente, seleccionan los iones en función de su velocidad, la cual depende, a su vez, de su masa. Los iones son acelerados por pulsos de potencial de unos 100 V y del orden de un microsegundo de duración, que se repiten miles de veces por segundo. Los iones adquieren una velocidad que es proporcional a $(e/m)^{1/2}$. El tiempo que cada ión tarda en llegar al detector (tiempo de vuelo) viene dado por:

$T = K (m/e)^{1/2}$ en donde K es una constante que depende de las características del instrumento ³¹²(e = carga del electrón) (m = masa partícula) (m/e = relación masa carga).

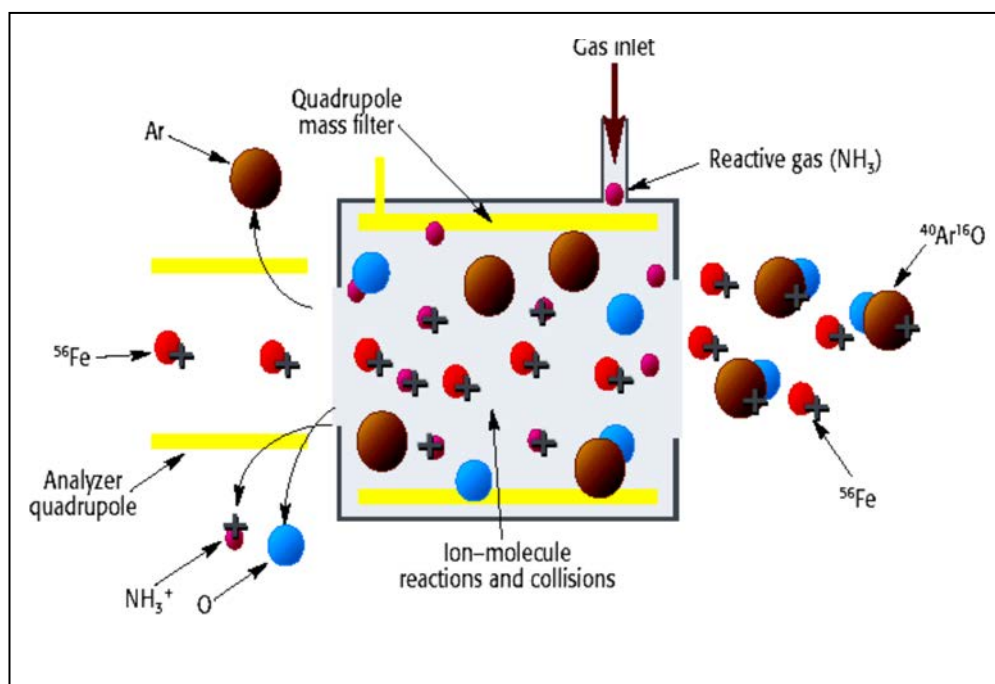
Figura 14 Diferente sensibilidad de un cuadrupolo que opera a 3, 1 ó 0,3 UMA de resolución (Spectroscopy).



Los separadores de masa de cuadrupolo sólo pueden detectar una masa en un momento determinado, por lo que requieren establecer un balance entre el número de elementos a analizar, los límites de detección, la precisión y el tiempo de lectura total. Sin embargo, los separadores de masa de tiempo de vuelo los iones son detectados en el mismo momento, lo que significa que se puede realizar un análisis multielemental sin ningún deterioro de la calidad.²⁹⁶

La mayor fuente de ruido en un ICP-MS proviene del parpadeo asociado a la introducción de la muestra a impulsos y la fluctuación del plasma, y la procedente de los fotones, electrones e iones que consiguen llegar al detector. Cuando las cuentas o señal del detector es elevada, la principal fuente de imprecisión la constituye la procedente de la fluctuación o parpadeo. Una de los métodos más efectivos para compensar ésta es la introducción de un estándar interno. Los separadores de masa por tiempo de vuelo tienen la ventaja de detectar el estándar interno y los analitos al mismo tiempo, asegurando una mejor corrección de las interferencias.²⁹⁶

Figura 15 Eliminación de la interferencia de ArO con una célula de reacción dinámica (Spectroscopy).



En el sistema separador de masas una segunda bomba turbomolecular mantiene un vacío de trabajo de aproximadamente 10⁻⁶ torr.²¹⁸ El sistema separador de masas tiene la función de discriminar el paso de los iones según su relación carga/masa. Dependiendo del diseño del sistema separador de masas, los iones llegarán secuencialmente o simultáneamente al detector.²⁹⁵

Para hacer el vacío previo, sin el cual no podrían funcionar las dos bombas turbomoleculares, se utiliza una bomba mecánica.

Asimismo, respecto a las interferencias podemos diferenciar cuatro tipos:⁴⁶

- isotópica: cuando existen isótopos de dos elementos con la misma relación carga/masa, por ejemplo, 58 Fe⁺ (57,9333) y 58 Ni⁺ (57,9353). Ésta puede ser evitada con una adecuada selección del isótopo a analizar.
- isobárica: producida por moléculas (óxidos, haluros, etc.), por ejemplo:

35Cl16O⁺ con 51V, o 40Ar12C⁺ con 52Cr, o 40Ar40Ar con 80Se.

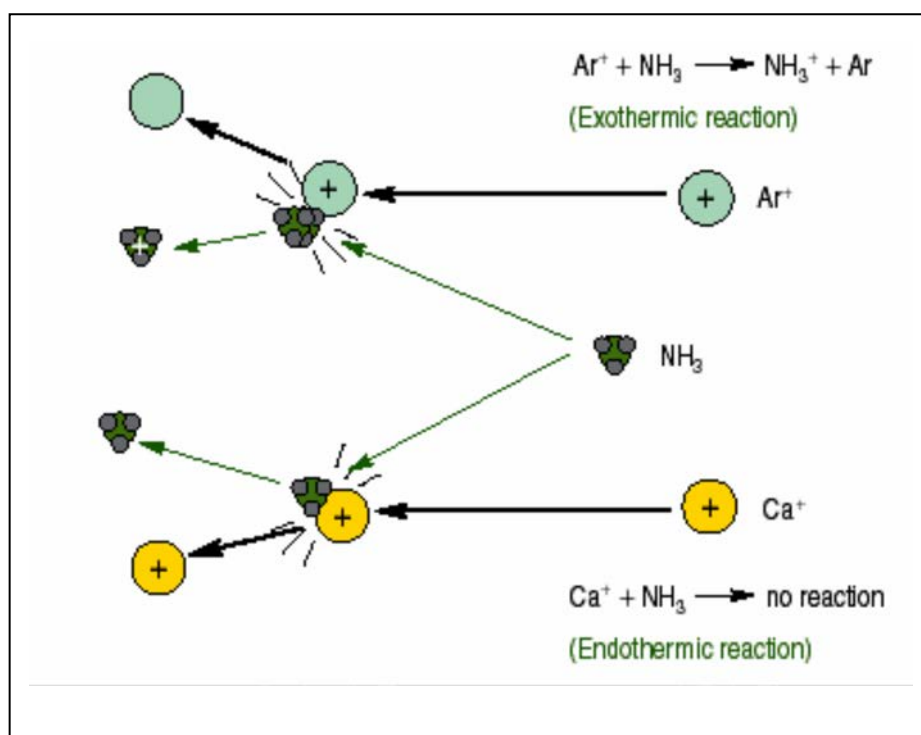
Éstas se pueden evitar con la introducción de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en el plasma o la utilización de vaporización electrotérmica. Está muy reducida en masas superiores.⁴⁹

- iones con doble carga: existen con más facilidad entre elementos de bajo potencial de ionización como el calcio, bario y lantánidos. De esta manera, el 48 Ca²⁺ interfiere con el 24 Mg⁺
- efecto matriz: suele provocar disminución de la señal al repelerse iones en el haz procedente del plasma. Así, cuando la concentración de un elemento es muy elevada, puede provocar una baja sensibilidad. Puede ser evitada variando la matriz o con una adecuada selección de la potencia de las lentes iónicas

Hay elementos con altos límites de detección por tener interferencias con especies poliatómicas de misma masa formadas por elementos procedentes de la muestra o el mismo

gas argón, como, por ejemplo, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ en la determinación de ^{56}Fe , ^{38}ArH en la determinación de ^{39}K , $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ en la determinación de ^{80}Se .²⁹³ En el caso de muestras biológicas, las interferencias derivadas de la utilización de argón afectan, principalmente, a la determinación de calcio, hierro, arsénico y selenio.²⁵⁸ Para evitar estas interferencias se utiliza una célula de reacción diseñada originalmente en espectrometría de masas para confirmar la estructura de la molécula origen por medio de la formación de nuevas especies por ionización química.²⁷¹ Uno de las técnicas utilizadas en ICP-MS que tienen este fundamento es la célula de reacción dinámica DRC “*Dynamic Reaction Cell*” en las que un gas reactivo, amoniaco o metano, se introduce en la célula de reacción situada entre la óptica iónica “*ion optics*” y el separador de masas.²⁹³ Como se observa en la figura 15, el gas NH_3 reacciona con $^{16}\text{O}^{40}\text{Ar}^+$ para formar argón y oxígeno atómicos y el Ion positivo de NH_3 , así, el ^{56}Fe se verá libre de interferencias. La célula de reacción dinámica aprovecha las diferentes velocidades de reacción del analito y las especies interferentes. Como se puede observar en la figura 16, en el caso de la interferencia ^{40}Ar y ^{40}Ca , el potencial de ionización del NH_3 (10,2 eV) es inferior al del argón (15,8 eV), por lo que la reacción de ionización de NH_3 al chocar con Ar^+ es exotérmica y rápida. Por el contrario la reacción de ionización del amoniaco al chocar con el Ca^+ (6,1 eV) es endotérmica y no se produce.²⁹³

Figura 16 La reacción entre el NH_3 y el Ar^+ es exotérmica mientras que no se produce reacción entre NH_3 y el Ca^+ (Spectroscopy).



Optimizando los campos eléctricos del cuadrupolo de la célula de reacción dinámica se impiden reacciones indeseables entre el gas y la muestra o el solvente.

Finalmente, un detector de iones convertirá la llegada de los iones en señal eléctrica.²⁸⁹ El diseño más frecuente es el de un dínodo. Los modelos con cuadroplos como separadores de masas utilizan un único detector mientras que los equipos con analizador de sector magnético, más especializados en determinar la relación isotópica, poseen detectores múltiples²⁸⁹. Para Rodushkin y Odman los equipos con sector magnético eliminan parte de las interferencias al tener una mayor resolución además de tener menos efecto matriz ^{241,242}.

La técnica ICP-MS tiene unos límites de detección unos tres o cuatro órdenes de magnitud superiores a los de la técnica ICP-OES.

Se pueden obtener elevadas resoluciones, de hasta 0,0001 Unidades de Masa Atómica, con la utilización de un separador de masas de doble enfoque, con la aplicación sucesiva de un campo eléctrico y otro magnético, aunque el precio de un equipo de estas características es bastante elevado^{46,228}.

Finalmente, los ICP-MS no realizan un análisis multielemental simultáneo, aunque al utilizar fracciones de segundo en leer varias líneas espectrales, permite un análisis secuencial de todo el espectro en un espacio de tiempo muy corto además de permitir la posibilidad de utilizar patrón interno para mejorar la precisión^{46,258}.

3.11.3.3 Instrumentación

Tabla 5 Perkin Elmer Elan DRC PLUS.

Spray chamber	Cyclonic
---------------	----------

Nebulizer	Meinhard®
RF power/W	1200
Ar nebulizer gas flow/L min ⁻¹	0.6-0.9 (optimized daily)
Measures	
Scan mode	Peak hopping
Resolution/amu	0.7
Replicate time/s	1
Dwell time/s	50
Sweeps/reading	25
Integration time/ms	1000
Replicates	3
Isotopes	⁸⁰ Se, ⁷⁴ Se, ⁶⁶ Zn, ⁶⁵ Cu, ¹¹⁴ Cd, ²⁰⁸ Pb, ²⁰⁹ Bi, ⁵⁹ Co, ⁵⁸ Ni, ⁵⁵ Mn, ⁷⁵ As, ⁵³ Cr, ²⁰⁵ Tl, ¹³⁸ Ba, ¹⁰⁷ Ag, ⁵² Cr, ⁵⁴ Fe, ⁵⁶ Fe, ⁹⁸ Mo, ⁸⁸ Sr, ⁷⁵ As, ²⁷ Al

Características del equipo²⁶

*Correction equations*³³³

$$Cd = {}^{114}Cd - (0.26825 \times {}^{118}Sn)$$

$$As = {}^{75}As - 3.127(ArCl\ 77 - (0.873 \times {}^{82}Se))$$

$$Fe = {}^{54}Fe - 0.028226 \times {}^{52}Cr$$

$$Ni = {}^{58}Ni - 0.003073 \times {}^{56}Fe$$

$$Ba = {}^{138}Ba - 0.000903 \times {}^{139}La - 0.002825 \times Ce$$

Standart interno: Rb y Ge

3.11.3.4 Reactivos

Los reactivos utilizados para la determinación de estos elementos fueron los siguientes:

- Estándar de Rhodio de Perkin-Elmer con una concentración de 1000 µg/mL
- Estándar de Germanio de Perkin-Elmer con una concentración de 1000 µg/mL
- Ácido Nítrico Suprapur (65%). Ácido clorhídrico Suprapur (37%)
- Estándar Multielemental de Perkin-Elmer con una concentración de 10 µg/mL
- Triton x-100 de Merck
- Estándar Multielemental Cláritas PPT 20 mg/L
- Agua de resistividad 18 MΩ.cm obtenida con un sistema Milli-Q (Millipore, Milford, EEUU)

3.11.3.5 Tratamiento de la muestra

Se realizó la digestión de la muestra en un tubo de polipropileno con tapón de rosca al que se añadió^{25,108}:

- 1 mL de una solución al 2% de triton x-100
- Mínimo 20 mg de la muestra, agua miliQ (blanco) o estándares
- 1 ml de ácido nítrico suprapur

Una vez tapado el tubo se deja digerir la muestra en una estufa a 80° C durante un mínimo de 16 horas. Al día siguiente, y después de haber dejado enfriar la misma hasta temperatura ambiente, verter la solución digerida en un tubo de 15 mL de polipropileno de tapón rojo y completar el peso hasta un gramo con agua MilliQ. Añadir entonces el diluyente estándar interno y comenzar el proceso de medición.

La curva de calibración se realizó utilizando 4 estándares con las siguientes concentraciones:

- Blanco de calibración
- Estándar 1: 10 µg/L
- Estándar 2: 20 µg/L
- Estándar 3: 40 µg/L
- Estándar 4: 80 µg/L

3.11.3.6 Método Analítico para determinación de Hg

La técnica de elección para la determinación de mercurio total en muestras biológicas y medioambientales es la Espectrofotometría de absorción atómica por vapor frío CVAAS. Ésta, es la utilizada preferiblemente por su gran sensibilidad, los límites de detección que puede alcanzar que oscilan entre 0,5-4,0 ng/g^{26,55,218} la ausencia de interferencias espectrales y el relativamente bajo coste de trabajo. Para mejorar la sensibilidad de esta técnica se podría utilizar una etapa previa de preconcentración por amalgama con oro, en otros casos la utilización de un detector de fluorescencia (CVAFS)¹⁴³ o la combinación de ambos.

En esta técnica los especímenes deben ser digeridos previamente. La determinación de mercurio total por CVAAS en muestras no digeridas es inviable por las interferencias producidas ante la presencia de materia orgánica. Se realiza una digestión ácida en caliente o mineralización, en la que se utilizan mezclas de ácidos y oxidante. Los métodos desarrollados en los años setenta basados en una digestión previa seguida de una reducción del mercurio con borohidruro sódico o cloruro de estaño (II) siguen siendo de uso generalizado.

La digestión con sulfúrico, únicamente, se demuestra insuficiente para oxidar el metilmercurio. La adición de permanganato potásico completa la oxidación del metilmercurio, pero puede provocar depósitos en el sistema que interfieren en la medida. Tampoco parece completa la digestión al utilizar sólo permanganato potásico. Las mezclas sulfúrico/persulfato y ácidos nítrico y perclórico son consideradas efectivas para la completa digestión de organomercuriales, aunque la primera parece no formar sustancias que interfieran con el agente reductor de borohidruro o cloruro de estaño (II) y evita los riesgos que implica el calentamiento del ácido perclórico. Cuando el ácido perclórico concentrado es calentado en presencia de materia orgánica o sustancias fácilmente oxidables puede producirse una explosión por lo que su utilización en la digestión de las muestras conlleva un cierto riesgo. Además, el ácido perclórico existente en el mercado contiene trazas de mercurio. El uso de permanganato potásico provoca la formación de óxido de manganeso (IV) que forma una película en los tubos de muestra y en los componentes del equipo en contacto con la misma, que puede interferir en la determinación de mercurio^{273,345}.

En la mineralización se deberá evitar la volatilización del mercurio. La principal preocupación es evitar la pérdida de mercurio por el aumento de temperatura utilizado durante la digestión. Para evitar la pérdida de mercurio volátil se utilizan sustancias

estabilizantes, generalmente dicromato potásico o permanganato potásico que actúan oxidando el mercurio a Hg(II) ^{144,229}.

Para liberar el mercurio gaseoso que será arrastrado por el gas argón a la celda de lectura por absorción atómica se utiliza Cloruro de estaño (II) o Borohidruro sódico¹³⁴.

3.11.3.7 Instrumentación

La concentración de mercurio en pelo se ha medido por la técnica CVAAS de vapor frío en un FIMS 400 de la casa comercial Perkin Elmer, espectrofotómetro de absorción atómica automatizado con un sistema integrado de inyección de flujo^{218,220}.

El equipo utiliza una celda con una longitud de 260 nm y una lámpara de mercurio como fuente de alimentación. Se utilizó un separador gas-líquido y un filtro de politetrafluoroetileno para evitar el paso de humedad con la subsiguiente reducción de señal.

a) Condiciones instrumentales

Longitud de onda: 253,7 nm

Rendija: 0,7 nm

Lectura: altura de pico

La lectura de absorbancia se efectúa en modo altura de pico con un tiempo de corrección de la línea base de 2 segundos, sin retraso en la lectura²⁶⁵. El programa utilizado en el equipo de análisis de mercurio se muestra en la tabla.

Tabla 6 Programa de inyección de flujo utilizado en el equipo de análisis de mercurio

Etapas	Tiempo (s)	Bomba 1 (rpm)	Bomba 2 (rpm)	Válvula	Lectura
prellenado	7	100	120	Llenado	No
1	10	100	120	Llenado	No
2	25	0	120	Inyección	Si

3.11.3.8 Reactivos

Los reactivos utilizados para la determinación de mercurio en pelo fueron los siguientes:

- Estándar de Mercurio de Perkin-Elmer con una concentración de mercurio 1000 µg/mL
- Ácido Nítrico Suprapur (65%)
- Ácido clorhídrico Suprapur (37%)
- Ácido sulfúrico Suprapur (97%)
- Hidróxido sódico (lentejas)
- Triton x-100 de Merck
- Solución antiespumante de silicona: Dow Corning antifoaming 110^a de Perkin Elmer
- Borohidruro sódico

- Dicromato potásico grado para análisis máximo 0,0000005% de Hg de Merck
- Agua de resistividad 18 M Ω .cm obtenida con un sistema Milli-Q (Millipore, Milford, EEUU)

3.11.3.9 Tratamiento de la muestra

Se realizó la digestión de la muestra en un tubo de polipropileno con tapón de rosca al que se añadió:

- 1 mL de una solución al 2% de triton x-100
- 0,5 mL de la muestra, agua milliQ (blanco) o estándares
- 100 μ L solución estabilizante (0,5% K₂Cr₂O₇ y 50% HNO₃)
- 1 mL de ácido nítrico suprapur
- 2 mL ácido sulfúrico

Una vez tapado el tubo se deja digerir la muestra en una estufa a 60° durante un mínimo de 16 horas. Al día siguiente, y después de haber dejado enfriar la misma hasta temperatura ambiente, se añade 5,4 mL de solución diluyente (1% HNO₃ y 2% H₂SO₄). A continuación se procede a la medición de la concentración de mercurio de la solución así preparada.

La curva de calibración se realizó utilizando tres estándares con las siguientes concentraciones:

- Blanco de calibración

- Estándar 1: 20 µg/L
- Estándar 2: 50 µg/L
- Estándar 3: 100 µg/L

Límite de detección y Cuantificación

El método ya estaba validado en el laboratorio donde se realizaron las muestras y publicado para determinación de Hg en sangre (López Colón en 2003). No obstante, se volvieron a evaluar los límites de detección y cuantificación para Hg en pelo, considerando diferentes cantidades de muestra.

Tabla 7 Límites de Detección y Cuantificación en función del peso de la muestra

LD	LC	Peso Muestra
0.0305	0.09 µg/g	10 mg
0.0061	0.018 µg/g	50 mg
0.0031	0.009µg/g	100 mg

Asimismo, se había visto en la validación inicial que el método era lineal hasta 120 µg/L. Esto supone un rango de aplicación del método suficientemente adecuado para nuestro propósito.

3.11.4. Estudio de validación

Para demostrar la validez de un método la norma UNE-EN-ISO 15189 que acredita competencia técnica para los laboratorios clínicos propone una serie de parámetros a determinar: límite de detección y de cuantificación, precisión, exactitud, linealidad, especificidad, intervalo de trabajo^{257,168}...

En este sentido, algunos de estos parámetros han sido determinados previamente a la determinación de nuestras muestras a fin de acreditar la fiabilidad de nuestros resultados

Por otro lado, y siguiendo los criterios de acreditación ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) es necesario que cada laboratorio establezca un sistema de evaluación de la calidad de sus ensayos que sea periódico y programado. Por ello, cada uno de los parámetros es evaluado con controles de calidad internos. Además, intervienen en ensayos externos de intercomparación.

3.11.4.1 Límite de detección. Límite de cuantificación

El *límite de detección* se define como la cantidad o concentración mínima de analito que puede, con fiabilidad, ser distinguida de cero.

Se encuentra ampliamente aceptado, para la validación de un método, que se estime multiplicando por 3 la desviación estándar de al menos 6 (recomendándose 20) determinaciones independientes y completas del procedimiento analítico de blancos o casi blancos de una matriz lo más similar posible a las muestras, teniendo en cuenta los valores cero o negativos.

Por otro lado, en una reunión de científicos de la ISO y de la IUPAC se introdujo el mismo concepto de la siguiente forma:

Límite de detección o concentración mínima detectable: es aquella concentración que, dado una probabilidad $1-\alpha$ de no confundirse con el blanco, tiene una probabilidad $1-\beta$ de no

ser tomado como un falso negativo. Los valores por defecto recomendados por la IUPAC son $\alpha=\beta=0,05$.

Al tratarse muchos de los elementos traza de elementos tóxicos, con un intervalo de referencia que encuentra su mayor trascendencia en su límite superior, es necesario determinar con más exactitud el límite de detección. Por ello, y dada la gran dificultad de disponer de una muestra libre de elementos traza se procede a estimar el límite de detección con un blanco de calibración. A tal efecto se determinan 30 blancos de calibración.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 8 Valores de las concentraciones de n: 30 réplicas de un blanco de calibración para el elemento Ag

Absorbancia					
1: -1.485	6: -1.479	11: -1.479	16: -1.485	21: -1.482	26: -1.482
2: -1.484	7: -1.481	12: -1.483	17: -1.481	22: -1.486	27: -1.479
3: -1.477	8: -1.487	13: -1.483	18: -1.483	23: -1.486	28: -1.482
4: -1.484	9: -1.477	14: -1.484	19: -1.480	24: -1.484	29: -1.483
5: -1.484	10: -1.482	15: -1.481	20: -1.483	25: -1.480	30: -1.484

$$S = 0,0028249$$

Para estimar el Límite de Detección (LD)¹⁶⁸ multiplicamos la desviación estándar (S) por 3,3

Es de esperar que el límite de cuantificación (LC) se encuentre cercano a 10 S

Tabla 9 Representación del Límite de Detección LD, Límite de Cuantificación LC y Coeficiente de Correlación r

	r	LD	LC
Al (µg/g)	0.999981	0.099	0.302
Fe (µg/g)	0.999515	0.810	2.660
Se (µg/g)	0.999929	0.160	0.533
Sr (µg/g)	0.999958	0.094	0.285
Zn (µg/g)	0.999792	0.255	0.772
Bi (µg/g)	0.999789	0.01	0.03
Co (ng/g)	0.999841	0.011	0.034
Ni (µg/g)	0.999893	0.195	0.650
Mn (ng/g)	0.999921	0.611	1.853
Ag (ng/g)	0.999992	0.0093	0.028
Mo (µg/g)	0.999952	0.015	0.048
Cd (ng/g)	0.999953	0.009	0.027
As (µg/g)	0.999935	0.05	0.16
Cr (µg/g)	0.999455	0.276	0.838

Cu (µg/g)	0.999881	0.039	0.120
Ba (µg/g)	0.999778	0.188	0.57
Tl (ng/g)	0.999874	0.001	0.004
Pb (µg/g)	0.999886	0.032	0.097

Estos Límites de Detección y Cuantificación se han alcanzado partiendo de una cantidad de muestra menor de 50 mg

En todas las muestras analizadas, los niveles de concentración del elemento Be se han encontrado inferiores del Límite de Detección (LD: 0,032 y LC: 0,098). Hecho este que concuerda con lo descrito en la bibliografía. Así, Goullé en Francia establecía un LC para el Be de 0,007 µg/g, junto con un intervalo de referencia para las muestras analizadas de (0,003-0,012) µg/g, resultados que se encuentran muy por debajo de nuestro LD¹¹⁵ (LD: 0,032). Por otro lado, en España en diferentes publicaciones consultadas concuerdan con nuestros hallazgos, dado que describen el Be por debajo del LD²⁰¹

3.11.4.2 Exactitud y Precisión

Todo método analítico lleva implícito un error sistemático y un error aleatorio. Sin embargo, todavía no existe un consenso global entre los documentos reguladores de los diferentes organismos (ISO, SFSTP, ICH, EURACHEM, CLSI, IUPAC, AOAC, FDA...) en cuanto a los términos exactitud, veracidad y precisión.

La SFSTP, ICH y EURACHEM, incorporan la terminología de la ISO, que define el término exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el

valor de referencia aceptado. El término exactitud cuando se aplica a un conjunto de resultados implica generalmente la combinación de componentes aleatorios y de un error sistemático o sesgo, por lo que la definición de exactitud “*accuracy*” incluiría el término veracidad “*trueness*”, que se define como el grado de concordancia entre la media obtenida de una serie de mediciones y el valor de referencia aceptado y refleja el error sistemático total.

Por otro lado, el término precisión se define como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos en mediciones repetidas de un mismo mensurando bajo condiciones establecidas y depende únicamente de la distribución de los errores aleatorios y no del valor verdadero o especificado. Esencialmente, la exactitud es la ausencia de error. Un método no es exacto si los resultados que proporciona no son precisos. En conjunto los términos, precisión y veracidad, describen la exactitud de un método.

El resultado final se puede expresar como exactitud o más correctamente inexactitud:

$$In/Exactitud: (Valor de Referencia - Valor Obtenido / Valor de Referencia) \times 100$$

a) Veracidad

La evaluación de la veracidad del procedimiento analítico del laboratorio se realiza normalmente utilizando materiales de referencia y aplicando pruebas de significación, aunque también se puede realizar a partir de la comparación de métodos o mediante el método de adiciones y el posterior estudio de la recuperación.

La veracidad se expresa en términos de sesgo o inexactitud “*bias*” y se calcula hallando la diferencia entre la media aritmética de las concentraciones halladas y el valor de referencia-aceptado en términos absolutos o relativos.

Se puede realizar la prueba t de Student-Fisher con n-1 grados de libertad, para ver si existen diferencias estadísticamente significativas entre la media hallada y el valor teórico, siempre y cuando el número de determinaciones *n* sea igual o superior a 30.

b) Precisión

La precisión se define como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos en mediciones repetidas de un mismo mensurando bajo unas condiciones establecidas.

La precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se computa como la desviación estándar de los resultados de la prueba en valor absoluto o como el coeficiente de variación en valor relativo

La precisión puede estudiarse bajo condiciones de repetibilidad, de reproducibilidad e intermedias. Las condiciones de repetibilidad son aquellas condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, en muestras idénticas, con el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida, durante un corto intervalo de tiempo y sin calibraciones entre las mediciones. Las condiciones de reproducibilidad, son aquellas condiciones bajo las que los resultados se obtienen con el mismo método, el mismo mensurando, en laboratorios diferentes, en diferentes equipos y con operadores distintos. Por último, las condiciones intermedias son aquellas que se encuentran entre las de repetibilidad y las de reproducibilidad.

De manera que repetibilidad y reproducibilidad son dos condiciones extremas de la precisión. La primera describe la mínima y la segunda la máxima variabilidad en los resultados.

Tanto la repetibilidad como la reproducibilidad son heterocedásticas, es decir, dependientes de la concentración del analito, por lo que se debe evaluar la precisión a distintos niveles de concentración, que deben estar cercanos o incluir los niveles de decisión clínicos.

En la validación de un método mediante un estudio intralaboratorio se debe estimar la precisión intermedia y la repetibilidad.

- **Precisión intermedia y repetibilidad**

Existen muchos factores que pueden contribuir a la variabilidad de los resultados de un método de medida, sin embargo los cuatro factores que más influyen en la precisión son:

- a) Tiempo: el intervalo de tiempo existente entre las mediciones.

- b) Calibración: si se ha calibrado entre las mediciones.
- c) Operador: si siempre es el mismo operador o son diferentes operadores los que llevan a cabo las mediciones.
- d) Equipo: si se utiliza el mismo equipo (o el mismo o diferentes lotes de reactivos) en las mediciones.

El objetivo de la determinación de la precisión intermedia es medir la capacidad del método de medida para repetir los resultados de la prueba bajo condiciones definidas.

En este sentido, organismos como EURACHEM consideran que 10 mediciones son suficientes para determinar la precisión. Por otro lado, la ISO 5725 recomienda que el número de mediciones sea como mínimo de 15 y finalmente, el CLSI11 recomienda un número de 20.

Como en el caso de la reproducibilidad, la imprecisión intermedia y la repetibilidad, se pueden expresar como desviación estándar DE o como coeficiente de variación CV (también denominado desviación estándar relativa % RSD).

- **Resultados**

Para la evaluación simultánea de la exactitud y la precisión se han analizado 4 controles de pelo con diferentes niveles de concentración tanto para el Hg como para el resto de elementos traza analizados en ICP-MS. En el caso general de éstos últimos se determinó uno de los controles durante 45 días (QMECAS 06H), otros dos durante 15 días diferentes (QMECAS 05H y 07H), realizando todos los días una nueva calibración y por último uno de ellos se utilizó para establecer el CV intradía o repetibilidad (QMECAS 010H) determinando dicha muestra 10 veces en el mismo día. Los resultados de elementos traza en ICP-MS se muestran a continuación en la tabla

Tabla 10 Resultados de controles de pelo para evaluar exactitud y precisión

		Control QMECAS 06H	Control QMECAS 05H	Control QMECAS 07H	Control QMECAS 010H
Ag	DIANA	0,77	0,261	1,739	1,3
	MEDIA	0,76	0,237	1,67	1,27
	DE	0,8095	0,068	0,055	0,024
	CV	10,39	5	3,2	1,9
	EXACTITUD	-5,129	9,2	3,5	2,3
Al	DIANA	33	19	159	319
	MEDIA	35,25	20,5	166	302,9
	DE	5,61	1,46	7,57	16,4
	CV	15,9	7,14	4,5	5,4
	EXACTITUD	6,8	-8	4,4	5,3
As	DIANA	0,19	1,95	2,64	3,4
	MEDIA	0,192	1,78	2,72	3,04
	DE	0,013	0,137	0,088	0,091
	CV	6,8	7,7	3,25	3
	EXACTITUD	-1,1	8,7	-3,011	10,5
Ba	DIANA	1,48	20,8	13,7	13,7
	MEDIA	1,62	20,07	13,96	13,96
	DE	0,201	1,044	0,941	0,941
	CV	12,3	5,2	6,7	6,7
	EXACTITUD				

		EXACITUD	9,4	3,5	-1,9	-1,9
Bi	DIANA					
	MEDIA					3,13
	DE					0,131
	CV					4,3
	EXACITUD					
Cd	DIANA	0,25	2,5	1,7		3,5
	MEDIA	0,29	2,2	1,58		3,2
	DE	0,002	0,065	0,022		0,058
	CV	0,96	3,02	1,42		1,8
	EXACITUD	16	12	6,7		8,5
Co	DIANA	0,48	0,31	6,12		4,45
	MEDIA	0,5	0,316	6,6		4,6
	DE	0,012	0,001	0,02		0,083
	CV	2,5	0,53	0,32		1,8
	EXACITUD	-5,6	-2,19	-7,2		-3,3
Cr	DIANA	1,25	5,7	8,6		0,67
	MEDIA	1,44	5,87	10		0,71
	DE	0,12	0,422	0,98		0,06
	CV	8,8	7,2	9,24		8,4
	EXACITUD	-15	-2,9	-16,2		-5,9

Cu	DIANA	107	53,7	132	77,4
	MEDIA	114	47,9	127,9	79
	DE	3,45	2,8	3,19	1,08
	CV	3,01	5,8	2,5	1,4
	EXACTITUD	-6,5	10,8	3,1	-2,1

Fe	DIANA				
	MEDIA		30,09		16,58
	DE		2,31		1,24
	CV		7,7		7,5
	EXACTITUD				

Mn	DIANA	0,93	1,8	5,64	1,87
	MEDIA	1,01	1,71	6,38	2
	DE	0,09	0,148	0,318	0,041
	CV	9,5	8,6	5	2
	EXACTITUD	-8,6	5	-13,1	-6,9

Mo	DIANA	26	1,3	0,473	1,01
	MEDIA	27,78	1,25	0,482	1,1
	DE	0,82	0,043	0,023	0,025
	CV	2,96	3,4	4,8	2,2
	EXACTITUD	-6,85	3,8	-1,79	-8,9

Ni	DIANA	2,67	5,85	6,6	5,2
-----------	-------	------	------	-----	-----

	MEDIA	3,1	6,04	6,9	5,5
	DE	0,019	0,382	0,121	0,171
	CV	0,59	6,3	1,749	2,9
	EXACTITUD	-16	-3,2	-4,5	-5,7
Pb	DIANA	14,8	5,28	5,85	13,2
	MEDIA	14,73	4,9	6,1	13,5
	DE	2,455	1	0,538	0,68
	CV	16,6	20,2	8,73	5
	EXACTITUD	0,43	7,1	-4,2	-2,2
Se	DIANA	0,53	5,1	2,15	1,2
	MEDIA	0,486	4,2	1,7	1,06
	DE	0,078	0,237	0,185	0,08
	CV	16	5,8	10,9	7,5
	EXACTITUD	8,3	17,3	20,9	11,6
Sr	DIANA				
	MEDIA		4,239		2,163
	DE		0,182		0,051
	CV		4,3		2,3
	EXACTITUD				
Tl	DIANA	0,45	0,05	2,15	0,016
	MEDIA	0,434	0,047	1,74	0,017

	DE	0,028	0,005	0,032	0,001
	CV	6,68	10,6	1,8	4,4
	EXACTITUD	3,55	6	19	-6,2
Zn	DIANA	101	311	169	403
	MEDIA	94,88	236	143	330
	DE	9,23	16,99	4,92	4,99
	CV	9,72	7,19	3,45	1,5
	EXACTITUD	6,06	24	15,3	18,1

DE: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación

La medición de la precisión intermedia se ha obtenido realizando las mediciones en tiempos diferentes, con diferentes operadores y variando la calibración.

Se observa que la imprecisión intermedia hallada está entre un 0,3 y un 17% (El valor del 20% para el Pb se promedió junto con el valor de un 8%, dado que ambas muestras partían de similar concentración, 5,28 y 5,85). En el caso de elementos traza, tanto esenciales como tóxicos, estos valores se consideran aceptables.

En cuanto al CV intradía o repetibilidad se asume que los valores obtenidos serán menores que los de reproducibilidad. En este caso el CV oscila entre 0.6% y 8.4%

Respecto al sesgo o inexactitud se cifra entre un 20 % y un 0,43%. Los valores excesivamente elevados aparecen en el Zn y en el Se en aquellas muestras de concentración muy elevada²⁴⁷.

En el caso del Hg se han analizado 4 controles de pelo con diferentes niveles de concentración. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la tabla

Tabla 11 Resultados de controles de Hg en pelo para evaluar exactitud y precisión

		IAEA 086	IAEA 085	Control QMECAS 06H 09	Control QMECAS 05H 06
Hg	DIANA	0,57 (0,53-0,61)	23,2(22,4-24,0)	4,49(3,15-5,38)	4,5 (3,5-5,5)
	MEDIA	0,54	23,3	4,59	4,73
	DE	0,014	0,579	0,357	0,405
	CV	2,62	2,48	7,76	7,76
	EXACTITUD	5,26	-0,43	-2,39	-5,22
	N	50	50	50	50

En lo que respecta al CV intradía o repetibilidad en el Hg se estima que es menor que el CV de reproducibilidad¹⁶¹. Para su determinación se prepararon y analizaron 10 muestras de 1 control de pelo del Institut National de Santé Publique du Québec (Canadá), el mismo día, con el mismo operador y curva de calibración, obteniéndose los resultados que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 12 Estimación de la repetibilidad de Hg en un nivel de control.

Control QMECAS 10 H 02		
HG	MEDIA	2,73
	DE	0,04
	CV intradía	1,293

	N	10
--	---	----

DE: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación intradía

3.11.4.3 Control de la calidad analítica

El control de la calidad analítica permite verificar el procedimiento analítico, comparar métodos y asegurar la transferibilidad de los resultados.

El material empleado para el control de la calidad analítica ha de ser de procedencia humana y la matriz similar a la de los especímenes (pelo, sangre, suero, orina...). Asimismo, las concentraciones han de comprender tanto aquellas que se sitúen dentro del intervalo de referencia como las que se encuentren fuera del mismo.

Para evaluar la fiabilidad analítica de los resultados se han utilizado como controles internos QMEQAS 06H-09 del Centro Toxicológico del Institut National de Santé Publique du Québec (Canadá) junto con GBW 09101 del Shanghai Institute of Nuclear Research (China) y el NCS ZC 81002B del National Analysis Center for Iron and Steel (China)

Además siguiendo los criterios de ENAC se participa en el programa de control de calidad externo internacional QMEQAS (ensayo de intercomparación) que organiza el Centro Toxicológico del Institut National de Santé Publique du Québec (Canadá) ¹¹¹

3.12 Método estadístico

Como programa estadístico se utilizó la aplicación SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences, Inc. Chicago, Illinois, USA) en su versión 20 para Windows®.

3.12.1 Estadística descriptiva

Para el análisis descriptivo de las variables cuantitativas se emplearon, como índices de tendencia central y de dispersión: la media aritmética y su desviación típica, o la mediana y el rango intercuartílico (RIC: percentil 25 – percentil 75), en función de asumirse, o no, respectivamente, el supuesto de la normalidad de las distribuciones.

El análisis descriptivo de los elementos traza nos hace ver que ninguno de ellos se ajusta a distribuciones normales. Como estadísticos descriptivos seleccionamos, por tanto, la mediana y los percentiles.

En todos los casos se comprobó la distribución de cada variable frente a los modelos teóricos (Kolmogorov- Smirnov y Shapiro-Wilk).

Para las variables categóricas se utilizaron sus frecuencias absolutas y relativas en tantos por ciento.

La representación gráfica de las variables cuantitativas se efectuó mediante gráficos de: barras, cajas o líneas y para las variables categóricas se utilizaron gráficos de: barras de frecuencia o sectores

- *Variables dependientes*: cuantitativas (19 elementos traza)
- *Variables independientes*:



dicotómicas: sexo



Cuantitativas: talla, peso



Politómicas



Edad: En el cuestionario se inscribe como fecha de nacimiento.

Es clasificada inicialmente en 5 grupos: 0-1, >1-5, 6-10, 11-15 y mayores de 15 años. Posteriormente, y debido a las limitaciones que pudieran surgir al emplear un grupo de menores de un año con únicamente 7 individuos se decide unificar este grupo con el de 1-5 años. Pasando a denominarse grupo de 0-5 años.

Finalmente, a fin de contrastar resultados con los datos de la bibliografía, es clasificada la población inicial en 16 grupos que van desde el grupo 0-1 hasta el grupo de mayores de 16 años

Frecuencia de consumo de pescado clasificada en 4 categorías.

Para el tratamiento de los datos, la variable frecuencia de consumo de pescado se dividió en las siguientes categorías: no consumidores, consumidores de una o dos veces por semana, consumidores de tres o cuatro veces por semana y consumidores de más de cuatro veces.

Posteriormente, y dado que era necesario para realizar el estudio de prevalencia la utilización de una variable dicotómica, el consumo de pescado se dividió en 2 categorías: Consumidores de menos de tres veces por semana y consumidores de tres o más veces por semana

3.12.3 Estadística inferencial

La medida de asociación entre dos variables categóricas se efectuó mediante la χ^2 de Pearson.

Para determinar la asociación entre una variable independiente dicotómica y dependiente cuantitativa. Si la variable dependiente vulneraba el supuesto de la normalidad (K-S) se empleó el test U de Mann Whitney. La medida del efecto se valoró mediante la diferencia de las medianas.

La medida de asociación entre una variable independiente politómica y dependiente cuantitativa se estimó con el test de Kruskal Wallis, dado el carácter no gaussiano de dicha variable cuantitativa. En todos los casos, como grado de significación estadística se consideró un valor $p < 0,05$

Asimismo, se estudió la asociación entre variables mediante el coeficiente de correlación de Spearman R^2

Por otro lado, por tratarse de un estudio trasversal se realizaron estimaciones de prevalencia, como la Razón de Prevalencia junto a su intervalo de confianza al 95%.

Finalmente, en todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error menor a 0,05.

Para realizar el análisis del tamaño muestral de los datos se utilizó como herramienta el paquete informático EPIDAT versión 3.0.

Resultados

4. Resultados

4.1 Características de la población estudiada

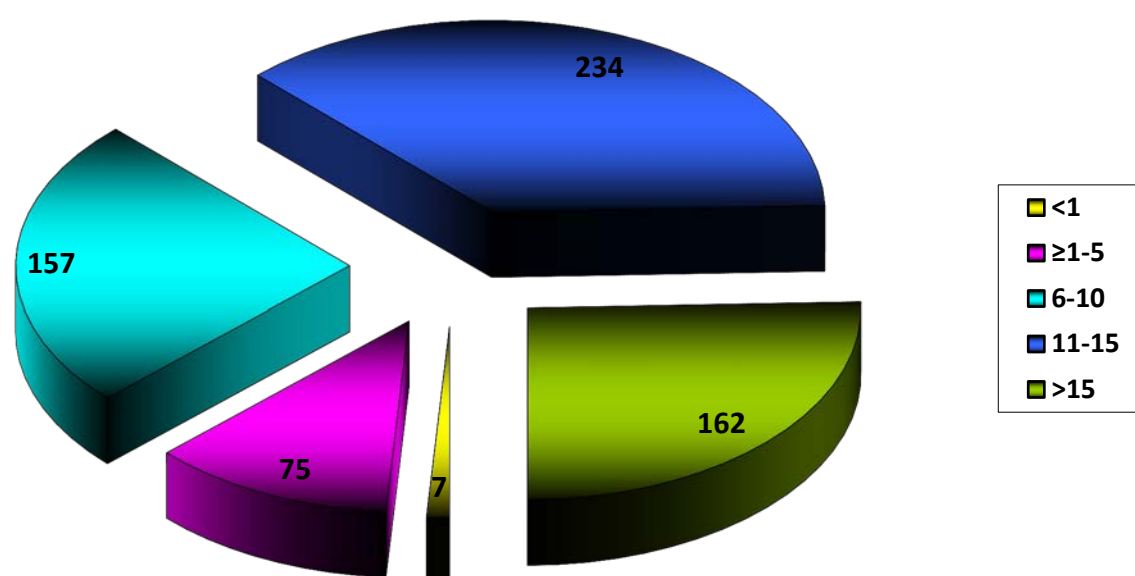
En el estudio participaron 648 niños. A todos los sujetos participantes se les administró el cuestionario de exposición al pescado. La tasa de respuesta fue del 97.9% (n=635).

Las características sociodemográficas de la población se representan a continuación en diferentes gráficos y tablas

En el estudio han participado 253 niños (39%) y 395 mujeres (61%).

Inicialmente, nuestra población es clasificada en 5 grupos (menores de 1 año, entre 1 y 5 años, entre 6 y 10 años, entre 11 y 15 años y mayores de 15 años). Posteriormente y debido a las limitaciones que pudieran surgir al emplear un grupo de menores de un año con únicamente 7 individuos se decide unificar este grupo con el de 1-5 años. Pasando a denominarse el nuevo grupo de 0-5 años.

Figura 17 Población categorizada en 5 grupos de edad



Finalmente quedan 4 grupos de la siguiente manera: Entre 0 y 5 años, entre 6 y 10 años, entre 11 y 15 años y mayores de 15 años.

Tabla 13 Población en función del sexo

	Número	Porcentaje
Niño/adolescente	253	39%
Niña/adolescente	395	61%

Figura 18 Categorías de edad de la población en función del sexo

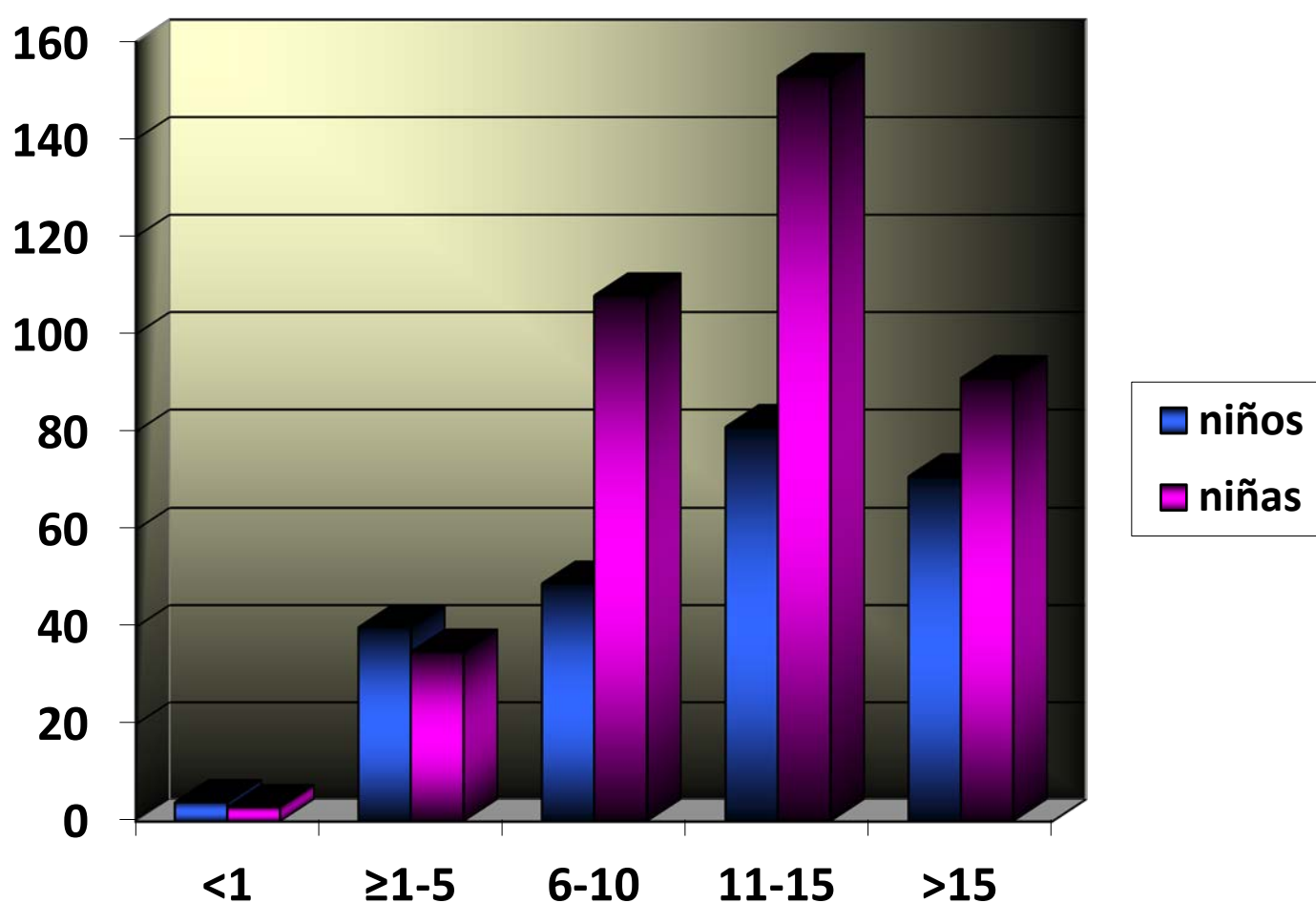


Tabla 14 Características constitucionales de los participantes en el estudio

	varón	mujer
Peso	36.7(20-57.3)	33.2(23.9-45)
Talla	1.49(1.15-1.7)	1.4(1.2-1.58)

Comentario tabla:

Las medias de peso y talla fueron 36,82 kg (DE=17,32) y 139,3 cm (DE=0,26) respectivamente. El 96,7% de los sujetos (474) presentaba peso normal, el 3% (15) de los niños tenía sobrepeso y un 0,3% (1) era obeso.

IMC: Índice de Masa Corporal.

Normal = $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$;

Sobrepeso $\geq 25,00$ y $< 30 \text{ kg/m}^2$ de IMC, y

Obeso $\geq 30 \text{ kg/m}^2$

4.2 Concentración de elementos traza en pelo

La Concentración de estos elementos queda reflejada en la siguiente tabla. En ella se muestran la mediana y los percentiles 5 y 95 que limitan nuestro Intervalo de Referencia y son los empleados para establecer los Valores de Referencia.

Asimismo, es incluida la media aritmética dado que aparece mencionada en muchos artículos de la bibliografía y podría ser útil como herramienta de evaluación y comparación con otras poblaciones

Tabla 15 Media Aritmética, Mediana e Intervalo de Referencia para Hg

	Media	Mediana	Intervalo de referencia	
			Percentil 5	Percentil 95
Hg (µg/g)	1.37	0.97	0.13	3.95

Tabla 16 Media Aritmética, Mediana e Intervalo de Referencia para el resto elementos traza

Elemento	Media	Mediana	Intervalo de Referencia
			(Percentil 5 – Percentil 95)
Al (µg/g)	23.82	18.5	4.94 - 63.2

Fe (µg/g)	17.29	15.45	7.5 - 33.7
Se (µg/g)	1.02	0.46	0.20 - 4.94
Sr (µg/g)	2.23	1.29	0.20 - 6.74
Zn (µg/g)	131	121	37.69 - 261
Bi (µg/g)	0.066	0.013	<0.01 - 0.288
Co (ng/g)	25.01	14.5	4.67 - 72.4
Ni (µg/g)	0.81	0.50	<0.195 - 1.74
Mn (ng/g)	398	328	115 - 940
Ag (ng/g)	421	196	32.0 – 1437
Mo (µg/g)	0.122	0.041	0.016 – 0.110
Cd (ng/g)	28.9	18.27	3.90 – 78.8
As (µg/g)	0.12	0.07	<0.05 – 0.26
Cr (µg/g)	0.53	0.360	<0.276 – 0.98
Cu (µg/g)	50.84	25.7	1.39 – 188.8
Ba (µg/g)	0.77	0.50	<0.188 – 1.79
Hg (µg/g)	1.37	0.97	0.13 – 3.95
Tl (ng/g)	0.44	0.28	0.048 – 1.19

Pb (µg/g)	1.23	0.7	0.17 – 4.28
------------------	------	-----	-------------

En la siguiente tabla se presentan los percentiles más significativos de la población estudiada. Al mismo tiempo, se muestran los valores mínimo y máximo de nuestra población, junto con el Límite de Cuantificación LC. Finalmente, se estudia el porcentaje de aquellos valores que son inferiores al LD.

Por otro lado, asumiendo las directrices de la Comisión para la Biomonitorización Humana en Alemania “HBM”¹²⁶ y las de la Comisión para Biomonitorización Humana en Canadá “CHMS”, *Canadian Health Measure Survey*,³³⁴ se ha asignado a aquellos resultados inferiores al LD el valor de 0.5 LD

Tabla 17 Percentiles significativos, Mínimo y Máximo de la población y Límite de Cuantificación

	LC	5	10	25	50	75	90	95	97.5	Min	Max
Al (µg/g)	0.302	4.94	6.11	1.35	18.5	29.9	45.1	63.2	84.1	0.5	150
Fe (µg/g)	2.660	7.5	9.1	11.6	15.45	20.2	28.0	33.7	40.2	2.1	88.0
Se (µg/g)	0.533	0.20	0.21	0.32	0.46	0.79	1.67	4.94	7.43	0.1	20.4
Sr (µg/g)	0.285	0.20	0.30	0.54	1.29	2.90	4.90	6.74	8.92	0.05	38.6
Zn (µg/g)	0.772	37.69	55.82	84.27	121	153	202	261	311	0.78	872
Bi (µg/g)	0.03	0.005	0.005	0.007	0.013	0.035	0.113	0.288	0.50	<LD	3.62
Co(ng/g)	0.034	4.67	5.68	8.70	14.5	24.7	46.3	72.4	138	1.2	436

Ni (µg/g)	0.650	0.097	0.20	0.31	0.50	0.82	1.30	1.74	2.76	<LD	34.0
Mn (ng/g)	1.853	115	145	204	328	496	759	940	1104	36	3600
Ag (ng/g)	0.028	32.0	43.6	88	196	434	882	1437	2581	0.097	7807
Mo (µg/g)	0.048	0.016	0.020	0.030	0.041	0.060	0.090	0.110	0.180	<LD	12.0
Cd (ng/g)	0.027	3.90	5.38	9.80	18.27	32.28	57.1	78.8	99.8	0.009	596
As (µg/g)	0.16	0.025	0.025	0.025	0.07	0.1	0.17	0.26	0.40	<LD	10.48
Cr (µg/g)	0.838	0.138	0.138	0.270	0.360	0.50	0.82	0.98	1.31	<LD	34.7
Cu (µg/g)	0.120	1.39	8.97	13.0	25.7	53.1	105.9	188.8	339.7	<LD	813
Ba (µg/g)	0.57	0.094	0.094	0.30	0.50	0.90	1.50	1.79	3.0	<LD	24.0
Hg (µg/g)	0.008	0.13	0.26	0.53	0.97	1.73	2.69	3.95	5.56	0.01	10.89
Tl (ng/g)	0.004	0.048	0.074	0.13	0.28	0.50	0.80	1.19	2.00	0.02	15.0
Pb (µg/g)	0.097	0.17	0.22	0.37	0.7	1.4	2.7	4.28	6.07	0.05	19.4
Percentiles	5	10	25	50	75	90	95	97.5			

Min: Mínimo; Max: Máximo.

El porcentaje de valores inferiores al LD en determinados elementos es el siguiente:

En Bi el 45% de sus resultados se muestran inferiores a su LD 0.01 $\mu\text{g/g}$, lo que implicaría aproximadamente 256 casos.

En As esta cifra alcanza un 39.6% (223 casos) inferiores a 0.05 $\mu\text{g/g}$.

En Cr un 25.2% (144 casos) se encuentran por debajo de 0.276 $\mu\text{g/g}$.

En Ba un 11.2% (64 casos) son inferiores a 0.188 $\mu\text{g/g}$.

En el caso del Ni esta cifra supone un 8.2% (47 casos) inferiores a 0.195 $\mu\text{g/g}$.

En Mo un 4.7% (27 casos) se encuentran por debajo de 0.015 $\mu\text{g/g}$.

Por último, el Cu cuenta únicamente con 4 casos de valores inferiores a 0.039 $\mu\text{g/g}$ lo que representa un 0.751%.

Por otra parte, en algunos elementos se han observado valores máximos muy elevados, datos éstos que necesitan consideración:

En el caso del Cd, en 2 muestras aparecen valores extremos alrededor de 500 ng/g. En ambos casos se ha confirmado que se trataba de 2 varones fumadores. En este sentido, esta descrito en la bibliografía que el humo del tabaco es una de las principales fuentes de exposición no ocupacional al Cd

Respecto al Mn aparecía un valor máximo de 3.600 ng/g. Al estudiar el caso se averigua que dicha muestra pertenece a un varón que presenta un cuadro de espectro autista. En la literatura científica aparecen muchas referencias que asocian el Mn a problemas de comportamiento, de aprendizaje, hiperactividad... En este caso se ha decidido no considerar este valor extremo.

En cuanto al Pb, un 97.5% de nuestra población mantiene valores por debajo de 6 $\mu\text{g/g}$. Por otro lado, por encima de seis aparecen 5 valores, todos ellos superiores a 9 $\mu\text{g/g}$.

Éstos son los siguientes: un niño de 6 años con un valor de 9.5 $\mu\text{g/g}$, una niña de 5 años con un valor de 11.2 $\mu\text{g/g}$, una adolescente de 17 años con un valor de 12 $\mu\text{g/g}$, otra niña de 12 años con un valor de 13.9 $\mu\text{g/g}$ y finalmente, un adolescente de 14 años con un valor de 19.4 $\mu\text{g/g}$.

Respecto al As se observa un valor máximo de 10 $\mu\text{g/g}$ que corresponde al valor de una adolescente de 14 años.

Asimismo, otros datos muy significativos son un valor extremo de Co de 436 ng/g que corresponde al valor de una adolescente de 17 años y un valor de Ag de una niña de 7 años de 7807 ng/g.

4.3 Variaciones en función de la edad

Los grupos etarios establecidos inicialmente en los que se categorizó nuestra población eran los siguientes:

- 0-5 años
- 6-10 años
- 11-15 años
- Mayores de 15 años

Desde este momento se estudian las diferencias que pueden encontrarse en los distintos grupos de edad. Para ello, se realiza un test de Kruskal-Wallis empleándose como estadístico de contraste Chi-cuadrado a fin de objetivar las diferencias entre la variable politómica categorizada en cuatro grupos de edad y las variables dependientes cuantitativas elementos traza.

En algunos casos no se incluye el elemento Hg dado que se estudiará posteriormente.

Los resultados de los diferentes grupos de edad por elemento se expresan en forma de mediana y rango intercuartílico (percentil 25 - percentil 75) dado que representa el modo habitual de representar estos resultados no paramétricos en la bibliografía consultada.

La significación estadística se demuestra con un $p < 0,05$

Tabla 18 Mediana y Rango Intercuartílico RIC (percentil 25-75) de los diferentes grupos de edad por elemento

Elemento traza	0-5 años	6-10 años	11-15 años	>15 años	p
Al (µg/g)	24.3(16.7-39.3)	21.93(15-33.7)	17.8(10.8-27.1)	13.1(6.6-25.6)	<0.001
Fe (µg/g)	17.4(13-21.1)	18.2(14.3-21.9)	14.8(11.5-19)	9.4(7.3-12.8)	<0.001
Se (µg/g)	0.4(0.3-0.6)	0.4(0.3-0.5)	0.5(0.37-1.04)	0.53(0.37-0.99)	<0.001
Sr (µg/g)	1.7(0.8-3.9)	1.3(2.9-0.5)	1.3(0.54-2.9)	1.63(3.82-0.7)	<0.001
Zn (µg/g)	68.2(41.8-100)	94(66.3-122)	131(101-158)	148(119-189)	<0.001
Bi (µg/g)	0.02(0.01-0.06)	0.02(0.01-0.05)	0.01(0.005-0.02)	0.006(0.004-0.01)	<0.001
Co (ng/g)	15.3(10.6-23.2)	17.2(10.8-26.3)	14.1(25.5-8.6)	11.47(6.59-21.9)	<0.001
Ni (µg/g)	0.7(0.50-1.21)	0.58(0.40-0.81)	0.47(0.8-0.3)	0.4(0.3-0.7)	<0.001
Mn (ng/g)	302(180-473)	377(241-549)	340(213-495)	275(166-464)	<0.001
Ag (ng/g)	304(182-608)	251(132-491)	164(73-349)	119(52-339)	<0.001

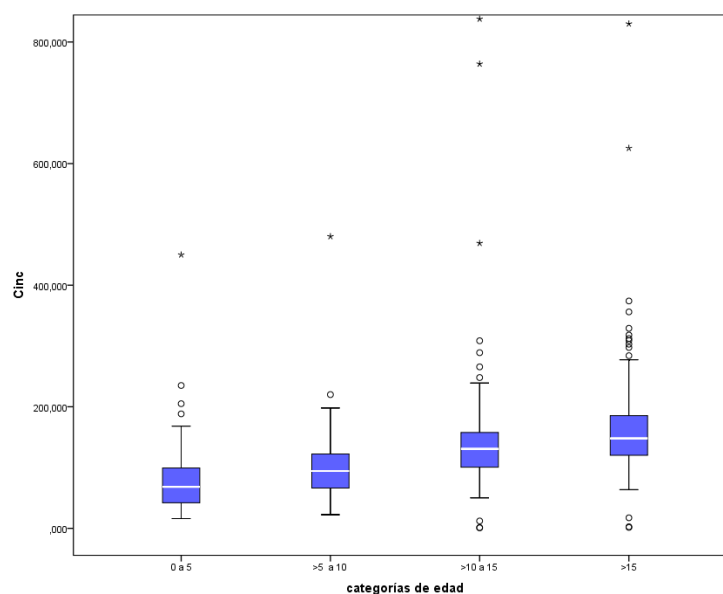
Mo (µg/g)	0.07(0.05-0.09)	0.06(0.04-0.08)	0.03(0.02-0.05)	0.03(0.02-0.05)	<0.001
Cd (ng/g)	22.0(14.1-37.5)	19.8(11.9-35.1)	15.7(8.5-29.4)	13.5(7.3-31.9)	<0.001
As (µg/g)	0.06(0.03-0.10)	0.07(0.05-0.11)	0.07(0.04-0.11)	0.05(0.02-0.08)	0.162
Cr (µg/g)	0.40(0.33-0.62)	0.41(0.32-0.55)	0.30(0.23-0.40)	0.32(0.24-0.50)	<0.001
Cu (µg/g)	16.3(11.0-29.3)	27.6(13.8-69.1)	27.0(10.8-54.1)	28.6(16.5-54.7)	<0.001
Ba (µg/g)	0.40(0.28-0.61)	0.53(0.3-0.9)	0.50(0.29-0.89)	0.55(0.32-1.10)	0.016
Hg (µg/g)	0.90(0.43-1.90)	1.02(0.46-1.89)	0.98(0.62-1.70)	0.86(0.48-1.56)	0.535
Tl (ng/g)	0.40(0.20-0.67)	0.32(0.20-0.64)	0.20(0.10-0.38)	0.23(0.12-0.40)	<0.001
Pb (µg/g)	1.1(0.70-2.12)	0.96(0.50-1.50)	0.52(0.30-1.20)	0.50(0.30-0.87)	<0.001

Mediana y RIC: Rango Intercuartílico

De los resultados obtenidos es necesario destacar que la mayoría de los elementos manifiestan diferencias por grupos de edad. Excepción a este patrón de comportamiento se muestra en el As, el Ba y el Hg

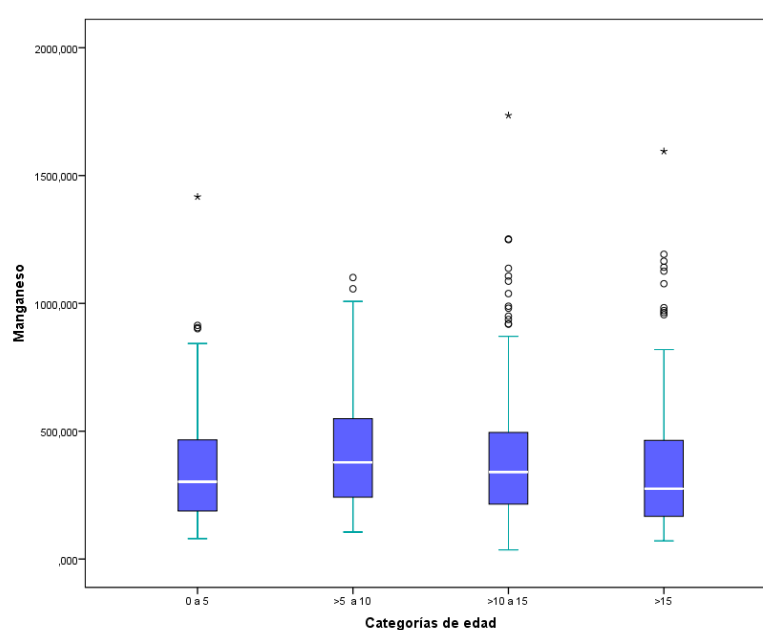
Asimismo, únicamente el Zn y en menor medida el Sr manifiestan un incremento significativo de su concentración con la edad. Véase gráfico a continuación

Figura 19 Diagrama de cajas variación concentración de Zn con la edad



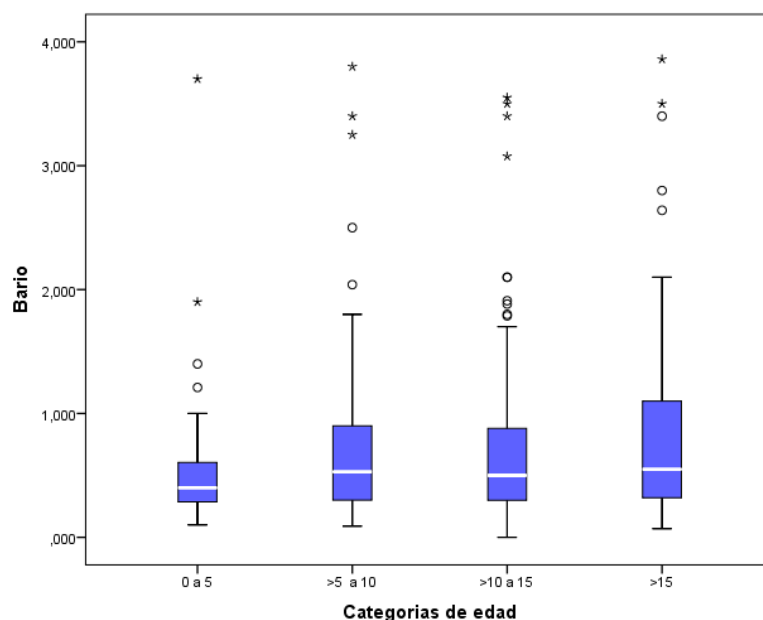
Por otro lado, elementos como el Mn no manifiestan un patrón claro de comportamiento. En el caso representado en el siguiente gráfico se observa inicialmente un incremento entre las categorías de 0-5 años y 6-10 años para posteriormente pasar a un descenso paulatino de los niveles de concentración con la edad.

Figura 20 Diagrama de cajas variación concentración de Mn con la edad



Además, aunque la mayoría de los elementos manifiestan diferencias por grupos de edad, existen tres elementos As, Ba y Hg que no siguen este patrón de comportamiento.

Figura 21 Diagrama de cajas variación concentración de Ba con la edad



Finalmente, la mayoría de los elementos muestran una clara tendencia a reducir los niveles de concentración con la edad. Véase en la representación gráfica del Pb y la Ag.

Figura 22 Diagrama de cajas variación concentración de Pb con la edad

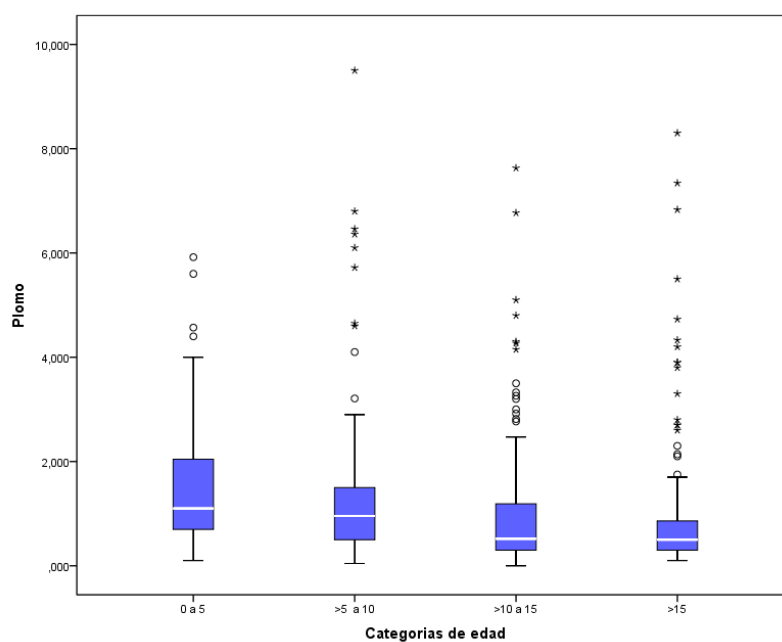
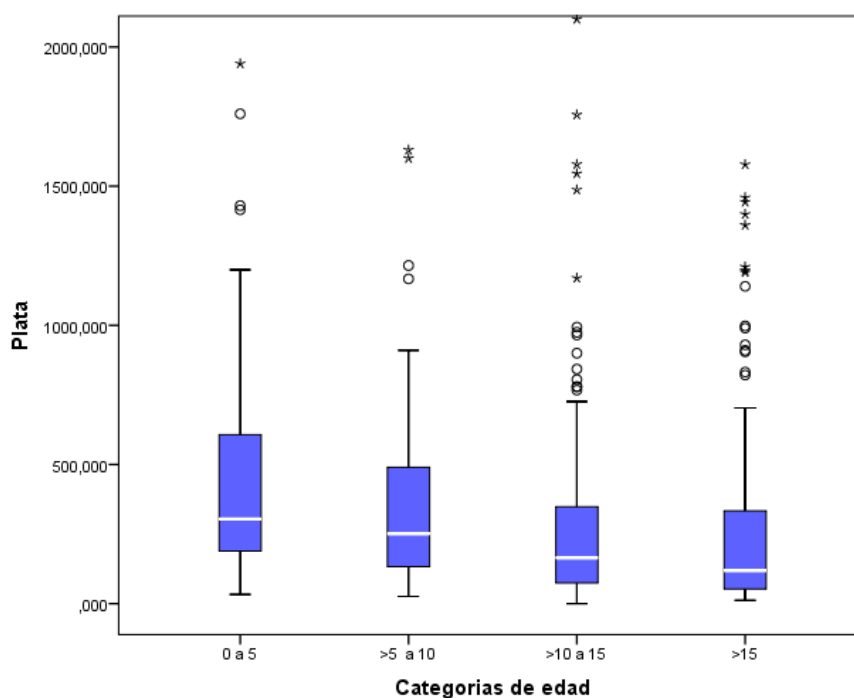


Figura 23 Diagrama de cajas variación concentración de Ag con la edad



En ese mismo sentido, se ha empleado el Test de Mann-Whitney para poner de manifiesto las diferencias entre los distintos grupos de edad. Para ello se van comparando los grupos por parejas, finalizando cuando se han enfrentado todos con todos. Dado que en este caso se realizan 6 comparaciones la significación estadística aparecerá cuando sea el valor $p < 0,01$

Tabla 19 Mediana y RIC para mostrar diferencias entre los diferentes grupos de edad (0-5 y 6-10) y (0-5 y 11-15) por elemento

Elemento	0-5	6-10	p	0 -5	11-15	p
Al (µg/g)	24.3(16.7-39.3)	21.93(15-33.7)	0.28	24.3(16.7-39.3)	17.8(10.8-27.1)	<0.001

Fe (µg/g)	17.4(13-21.1)	18.2(14.3-21.9)	0.65	17.4(13-21.1)	14.8(11.5-19)	0.002
Se (µg/g)	0.4(0.3-0.6)	0.4(0.3-0.5)	0.69	0.4(0.3-0.6)	0.5(0.37-1.04)	0.002
Sr (µg/g)	1.7(0.8-3.9)	1.3(2.9-0.5)	0.006	1.7(0.8-3.9)	1.3(0.54-2.9)	0.001
Zn (µg/g)	68.2(41.8-100)	94(66.3-122)	<0.001	68.2(41.8-100)	131(101-158)	<0.001
Bi (µg/g)	0.02(0.01-0.06)	0.02(0.01-0.05)	0.248	0.02(0.01-0.06)	0.01(0.005-0.02)	<0.001
Co (ng/g)	15.3(10.6-23.2)	17.2(10.8-26.3)	0.426	15.3(10.6-23.2)	14.1(8.6-25.5)	0.303
Ni (µg/g)	0.7(0.50-1.21)	0.58(0.40-0.81)	0.006	0.7(0.50-1.21)	0.47(0.8-0.3)	<0.001
Mn (ng/g)	302(180-473)	377(241-549)	0.016	302(180-473)	340(213-495)	0.221
Ag (ng/g)	304(182-608)	251(132-491)	0.04	304(182-608)	164(73-349)	<0.001
Mo (µg/g)	0.07(0.05-0.09)	0.06(0.04-0.08)	<0.001	0.07(0.05-0.09)	0.03(0.02-0.05)	<0.001
Cd (ng/g)	22.0(14.1-37.5)	19.8(11.9-35.1)	0.298	22.0(14.1-37.5)	15.7(8.5-29.4)	0.002
As (µg/g)	0.06(0.03-0.10)	0.07(0.05-0.11)	0.103	0.06(0.03-0.10)	0.07(0.04-0.11)	0.22
Cr (µg/g)	0.40(0.33-0.62)	0.41(0.32-0.55)	0.63	0.40(0.33-0.62)	0.30(0.23-0.40)	<0.001
Cu (µg/g)	16.3(11.0-29.3)	27.6(13.8-69.1)	<0.001	16.3(11.0-29.3)	27.0(10.8-54.1)	0.047
Ba (µg/g)	0.40(0.28-0.61)	0.53(0.3-0.9)	0.01	0.40(0.28-0.61)	0.50(0.29-0.89)	0.053
Hg (µg/g)	0.90(0.43-1.90)	1.02(0.46-1.89)	0.753	0.90(0.43-1.90)	0.98(0.62-1.70)	0.695
Tl (ng/g)	0.40(0.20-0.67)	0.32(0.20-0.64)	0.391	0.40(0.20-0.67)	0.20(0.10-0.38)	<0.001
Pb (µg/g)	1.1(0.70-2.12)	0.96(0.50-1.50)	0.78	1.1(0.70-2.12)	0.52(0.30-1.20)	<0.001

p debe ser < del resultado obtenido al dividir 0,05/ 6 diferencias =0,008 (aprox 0,01)

Considerando los resultados de la tabla anterior en relación con los grupos de edad 0-5 y 6-10 años, se observan diferencias significativas en 6 elementos Sr, Zn, Ni, Mo, Cu y Ba. En tres de los mismos, véase Sr, Ni y Mo, la concentración alcanzada es superior en el grupo etario 0-5 años. Por el contrario, en los otros 3 elementos Zn, Cu y Ba, la concentración es mayor en los niños de 6 a 10 años.

Asimismo, respecto a los grupos de edad 0-5 y 11-15 años se observa un cambio en la dinámica de comportamiento objetivándose con un gran incremento en el número de elementos diferenciados entre ambos grupos, pasando a ser este número de 13. Entre los elementos diferenciados únicamente dos de ellos Se y Zn mantienen una concentración superior en el grupo de mayor edad. El resto Al, Fe, Sr, Bi, Ni, Ag, Mo, Cd, Cr, Tl y Pb presentan niveles más elevados en el grupo de menor edad.

Tabla 20 Mediana y RIC para mostrar diferencias entre los diferentes grupos de edad (0-5 y >15) y (6-10 y 11-15) por elemento

Elemento	0-5	>15	p	6-10	11-15	p
Al (µg/g)	24.3(16.7-39.3)	13.1(6.6-25.6)	<0.001	21.93(15-33.7)	17.8(10.8-27.1)	<0.001
Fe (µg/g)	17.4(13-21.1)	9.4(7.3-12.8)	<0.001	18.2(14.3-21.9)	14.8(11.5-19)	<0.001
Se (µg/g)	0.4(0.3-0.6)	0.53(0.37-0.99)	0.002	0.4(0.3-0.5)	0.5(0.37-1.04)	<0.001
Sr (µg/g)	1.7(0.8-3.9)	1.63(3.82-0.7)	<0.001	1.3(2.9-0.5)	1.3(0.54-2.9)	0.621
Zn (µg/g)	68.2(41.8-100)	148(119-189)	<0.001	94(66.3-122)	131(101-158)	<0.001
Bi (µg/g)	0.02(0.01-0.06)	0.006(0.004-0.01)	0.006	0.02(0.01-0.05)	0.01(0.005-0.02)	<0.001

Co (ng/g)	15.3(10.6-23.2)	11.47(6.59-21.9)	0.01	17.2(10.8-26.3)	14.1(8.6-25.5)	0.069
Ni (µg/g)	0.7(0.50-1.21)	0.4(0.3-0.7)	<0.001	0.58(0.40-0.81)	0.47(0.8-0.3)	0.012
Mn (ng/g)	302(180-473)	275(166-464)	0.541	377(241-549)	340(213-495)	0.096
Ag (ng/g)	304(182-608)	119(52-339)	<0.001	251(132-491)	164(73-349)	<0.001
Mo (µg/g)	0.07(0.05-0.09)	0.03(0.02-0.05)	<0.001	0.06(0.04-0.08)	0.03(0.02-0.05)	<0.001
Cd (ng/g)	22.0(14.1-37.5)	13.5(7.3-31.9)	<0.001	19.8(11.9-35.1)	15.7(8.5-29.4)	0.025
As (µg/g)	0.06(0.03-0.10)	0.05(0.02-0.08)	0.084	0.07(0.05-0.11)	0.07(0.04-0.11)	0.545
Cr (µg/g)	0.40(0.33-0.62)	0.32(0.24-0.50)	<0.001	0.41(0.32-0.55)	0.30(0.23-0.40)	<0.001
Cu (µg/g)	16.3(11.0-29.3)	28.6(16.5-54.7)	<0.001	27.6(13.8-69.1)	27.0(10.8-54.1)	0.068
Ba (µg/g)	0.40(0.28-0.61)	0.55(0.32-1.10)	0.002	0.53(0.3-0.9)	0.50(0.29-0.89)	0.439
Hg µg/g)	0.90(0.43-1.90)	0.86(0.48-1.56)	0.563	1.02(0.46-1.89)	0.98(0.62-1.70)	0.774
Tl (ng/g)	0.40(0.20-0.67)	0.23(0.12-0.40)	<0.001	0.32(0.20-0.64)	0.20(0.10-0.38)	<0.001
Pb (µg/g)	1.1(0.70-2.12)	0.50(0.30-0.87)	<0.001	0.96(0.50-1.50)	0.52(0.30-1.20)	<0.001

En el estudio de los resultados de la tabla anterior en relación con los grupos de edad 0-5 y mayores de 15 años se observan diferencias significativas en 16 elementos, únicamente no manifiestan diferencias entre los dos grupos de edad el Mn, As y Hg. En cuatro de los mismos, véase Se, Zn, Cu y Ba, la concentración alcanzada es superior en el grupo etario de mayor edad. Por el contrario, en el resto de ellos la concentración es superior en los niños de menor edad 0 a 5 años.

Por otro lado, respecto a los grupos de edad 6-10 y 11-15 años se manifiestan diferencias significativas en 10 elementos Al, Fe, Se, Zn, Bi, Ag, Mo, Cr, Tl y Pb. Entre los elementos diferenciados únicamente dos de ellos Se y Zn mantienen una concentración superior en el grupo de mayor edad. El resto presentan niveles más elevados en el grupo de menor edad.

Así, uno de los elementos, Ni, aun no presentando rigurosamente significación estadística ($p: 0.012$), muestra una clara diferencia entre ambos grupos (6-10 y 11-15 años). Siendo mayor su concentración en el grupo de menor edad.

Tabla 21 Mediana y RIC para mostrar diferencias entre los diferentes grupos de edad (6-10 y >15) y (11-15 y >15) por elemento

Elemento	6-10	>15	p	11-15	>15	p
Al (µg/g)	21.93(15-33.7)	13.1(6.6-25.6)	<0.001	17.8(10.8-27.1)	13.1(6.6-25.6)	0.004
Fe (µg/g)	18.2(14.3-21.9)	9.4(7.3-12.8)	<0.001	14.8(11.5-19)	9.4(7.3-12.8)	0.002
Se (µg/g)	0.4(0.3-0.5)	0.53(0.37-0.99)	<0.001	0.5(0.37-1.04)	0.53(0.37-0.99)	0.839
Sr (µg/g)	1.3(2.9-0.5)	1.63(3.82-0.7)	0.103	1.3(0.54-2.9)	1.63(3.82-0.7)	0.199
Zn (µg/g)	94(66.3-122)	148(119-189)	<0.001	131(101-158)	148(119-189)	<0.001
Bi (µg/g)	0.02(0.01-0.05)	0.006(0.004-0.01)	0.056	0.01(0.005-0.02)	0.006(0.004-0.01)	0.018
Co (ng/g)	17.2(10.8-26.3)	11.47(6.59-21.9)	<0.001	14.1(8.6-25.5)	11.47(6.59-21.9)	0.064
Ni (µg/g)	0.58(0.40-0.81)	0.4(0.3-0.7)	<0.001	0.47(0.8-0.3)	0.4(0.3-0.7)	0.262
Mn (ng/g)	377(241-549)	275(166-464)	<0.001	340(213-495)	275(166-464)	0.027

Ag (ng/g)	251(132-491)	119(52-339)	<0.001	164(73-349)	119(52-339)	0.187
Mo (µg/g)	0.06(0.04-0.08)	0.03(0.02-0.05)	<0.001	0.03(0.02-0.05)	0.03(0.02-0.05)	0.307
Cd (ng/g)	19.8(11.9-35.1)	13.5(7.3-31.9)	0.011	15.7(8.5-29.4)	13.5(7.3-31.9)	0.606
As (µg/g)	0.07(0.05-0.11)	0.05(0.02-0.08)	<0.001	0.07(0.04-0.11)	0.05(0.02-0.08)	<0.001
Cr (µg/g)	0.41(0.32-0.55)	0.32(0.24-0.50)	<0.001	0.30(0.23-0.40)	0.32(0.24-0.50)	0.086
Cu (µg/g)	27.6(13.8-69.1)	28.6(16.5-54.7)	0.730	27.0(10.8-54.1)	28.6(16.5-54.7)	0.041
Ba (µg/g)	0.53(0.3-0.9)	0.55(0.32-1.10)	0.433	0.50(0.29-0.89)	0.55(0.32-1.10)	0.125
Hg (µg/g)	1.02(0.46-1.89)	0.86(0.48-1.56)	0.224	0.98(0.62-1.70)	0.86(0.48-1.56)	0.167
Tl (ng/g)	0.32(0.20-0.64)	0.23(0.12-0.40)	<0.001	0.20(0.10-0.38)	0.23(0.12-0.40)	0.050
Pb (µg/g)	0.96(0.50-1.50)	0.50(0.30-0.87)	<0.001	0.52(0.30-1.20)	0.50(0.30-0.87)	0.630

Teniendo en cuenta los resultados reflejados en la tabla anterior en relación con los grupos de edad 6-10 y mayores de 15 años, se pueden visualizar diferencias significativas en 14 elementos. En dos de los mismos, de nuevo Se y Zn, la concentración alcanzada es superior en el grupo etario mayores de 15 años. Por el contrario, el resto de ellos Al, Fe, Co, Ni, Mn, Ag, Mo, Cd, As, Cr, Tl y Pb presenta una concentración mayor en los niños de 6 a 10 años.

Además, considerando los grupos de edad 11-15 y mayores de 15 años queda de manifiesto la gran disminución en la variación entre estos dos grupos, comportándose ambos de una manera similar. Así, únicamente en cuatro elementos Al, Fe, Zn y As se muestran diferencias. El Zn mantiene el mismo patrón en todos los grupos de edad y muestra una

concentración superior en el grupo de mayor edad. El resto Al, Fe y As presentan niveles más elevados en el grupo de menor edad.

4.4 Variaciones en función del sexo

Se ha utilizado el test de Mann-Whitney para apreciar las posibles diferencias en los distintos elementos traza en función del sexo (varón – hembra).

En la tabla expuesta se visualizan la medianas de cada elemento junto con su rango intercuartílico RIC (percentil 25 - percentil 75) y en ella se pueden observar aquellos elementos en los que aparece diferencia estadísticamente significativa entre sexos con un valor $p < 0.05$.

Tabla 22 Mediana y RIC para mostrar diferencias en función del sexo por elemento

Elemento traza	<i>varón</i>	<i>hembra</i>	p
Al (µg/g)	17.5(9.8-28.1)	19.1(10.4-31.1)	0.291
Fe (µg/g)	14.5(11.0-21.0)	15.9(12.0-20.0)	0.293
Se (µg/g)	0.5(0.33-0.80)	0.43(0.31-0.76)	0.307
Sr (µg/g)	0.61(0.32-1.49)	2.23(1.00-3.97)	<0.001
Zn (µg/g)	125.7(89.5-153.6)	113.0(79.7-153.6)	0.144
Bi (µg/g)	0.010(0.006-0.030)	0.016(0.009-0.049)	<0.001

Co (ng/g)	10.6(6.9-16.8)	18.59(11.48-30.57)	<0.001
Ni (µg/g)	0.48(0.30-0.79)	0.56(0.37-0.86)	0.005
Mn (ng/g)	289(172-473)	358(238-507)	<0.001
Ag (ng/g)	116.0(54.0-270.2)	267.6(143.0-593.7)	<0.001
Mo (µg/g)	0.045(0.030-0.069)	0.04(0.03-0.06)	0.195
Cd (ng/g)	14.6(7.9-26.8)	22.0(11.6-36.8)	<0.001
As (µg/g)	0.062(0.040-0.099)	0.07(0.04-0.11)	0.162
Cr (µg/g)	0.39(0.29-0.55)	0.35(0.26-0.50)	0.052
Cu (µg/g)	16.1(10.7-31.0)	33.5(17.0-73.2)	<0.001
Ba (µg/g)	0.40(0.20-0.60)	0.67(0.39-1.05)	<0.001
Hg (µg/g)	0.97(0.53-1.85)	0.97(0.54-1.71)	0.877
Tl (ng/g)	0.36(0.20-0.60)	0.20(0.10-0.40)	<0.001
Pb (µg/g)	0.60(0.37-1.29)	0.70(0.36-1.43)	0.144

En un estudio pormenorizado se puede establecer lo siguiente:

Aparecen diferencias varón – hembra en los siguientes elementos: Sr, Bi, Co, Mn, Ag, Cd, Cu, Ba y Tl.

Mayoritariamente aparece una concentración más elevada de cada uno de estos elementos en el grupo femenino. Únicamente en el caso del Tl se observa un mayor nivel de dicho compuesto en el varón. En este mismo sentido se puede apreciar que aun no existiendo

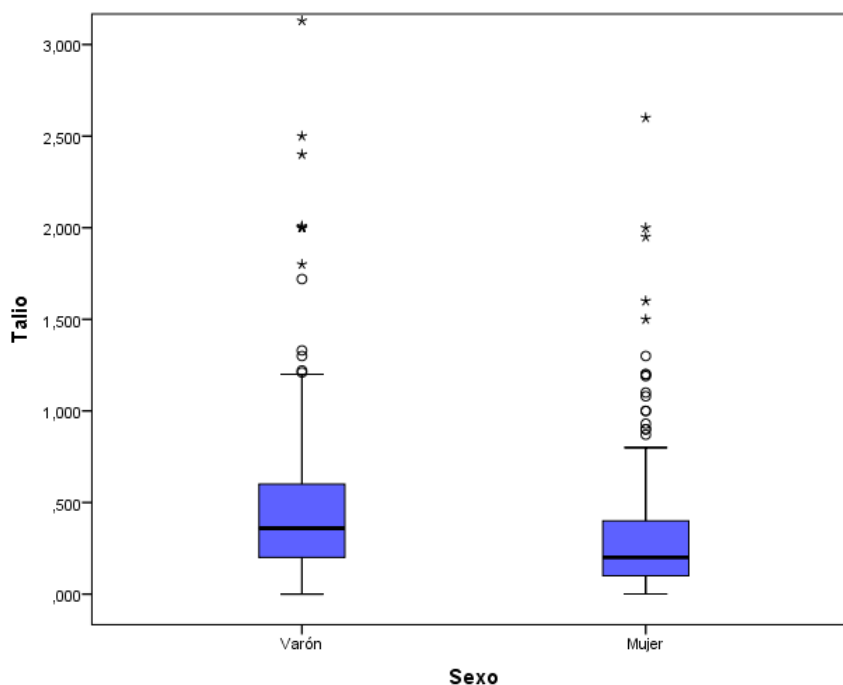
diferencia estadísticamente significativa en el caso del Cr se manifiestan valores superiores de dicho elemento en el varón.

Esta diferencia es especialmente manifiesta en elementos como la Ag en los que en el grupo femenino esta aumentada la concentración en aproximadamente 152 ng/g respecto al masculino. En el caso del Cu, Co y Cd ocurre algo similar, las niñas presentan respectivamente 17.4, 7.99 y 7.4 $\mu\text{g/g}$ más del elemento en cuestión que los niños. Finalmente, en el resto de los elementos las diferencias van siendo menos significativas

En los gráficos box plot siguientes se ponen de manifiesto de forma visual las diferencias varón – hembra.

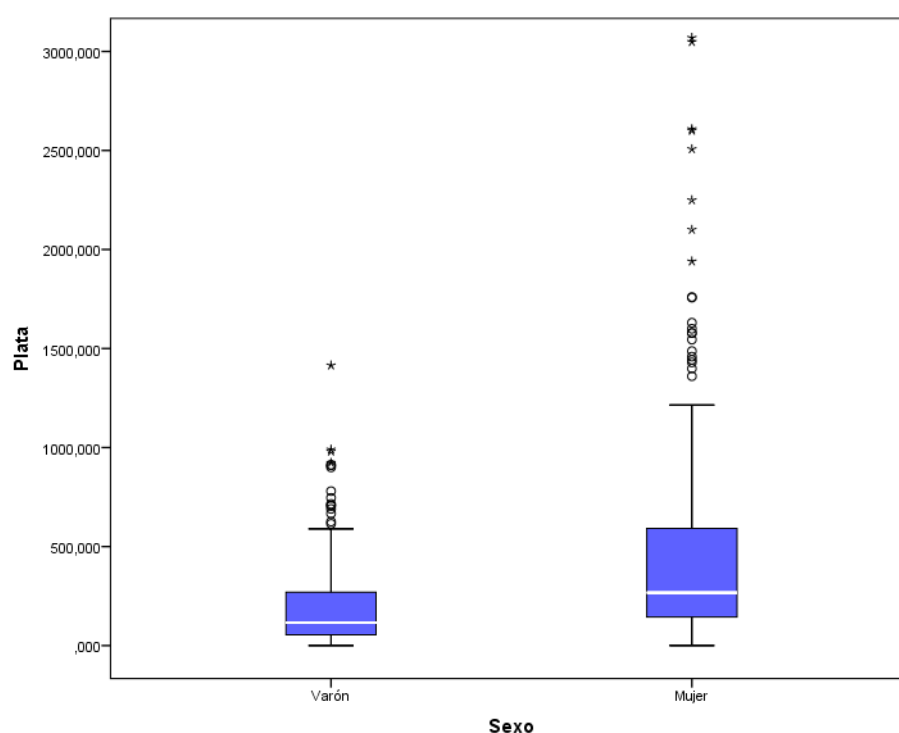
En este sentido, el primer elemento reflejado en el gráfico siguiente es el Tl. Se ha comenzado por esta representación gráfica dado que éste sigue un patrón diferente al resto de los elementos. Como se ha visto anteriormente su concentración es superior en el varón.

Figura 24 Diagrama de cajas variación concentración de Tl en función del sexo



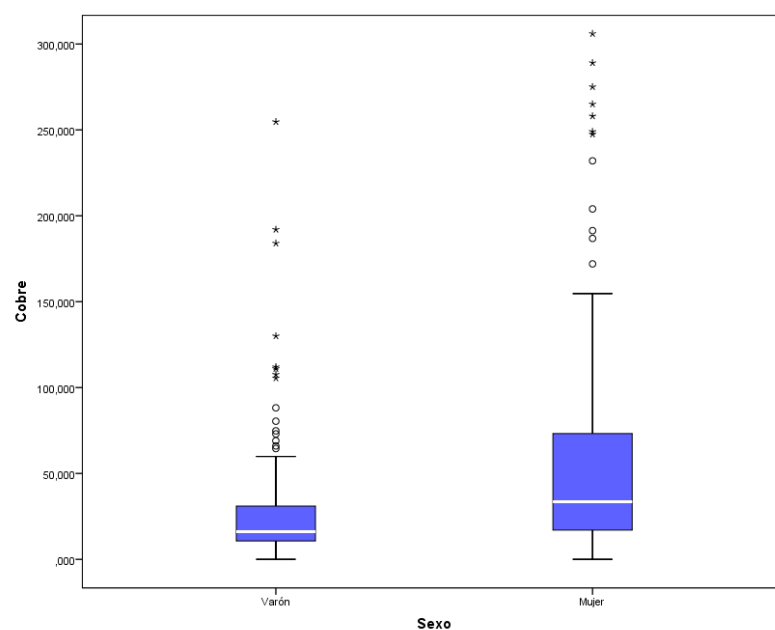
En el resto de los elementos en los que se manifiestan diferencias en función del sexo el patrón de comportamiento será similar, en todos ellos las niñas mostrarán concentraciones más elevadas que los niños. Así, en el caso de la Ag, el grupo de las niñas presenta una concentración superior en aproximadamente 152 ng/g respecto al grupo de los niños.

Figura 25 Diagrama de cajas variación concentración de Ag en función del sexo



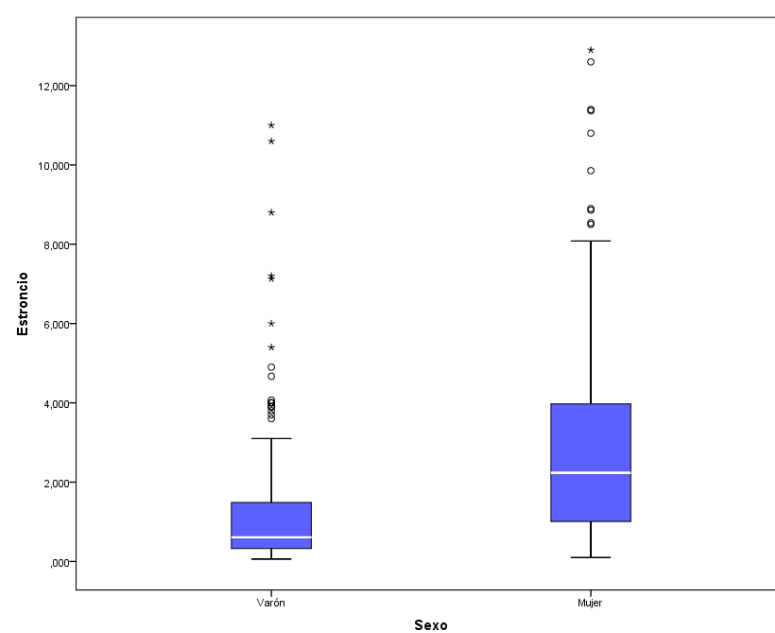
Como se indicó anteriormente en el caso del Cu las niñas presentan una media de 17.4 $\mu\text{g/g}$ más que los niños.

Figura 26 Diagrama de cajas variación concentración de Cu en función del sexo



Como último ejemplo gráfico incluimos el Sr en el que al igual que en resto de elementos de las gráficas anteriores, el grupo femenino presenta aproximadamente 1.62 $\mu\text{g/g}$ más que el grupo masculino.

Figura 27 Diagrama de cajas variación concentración de Sr en función del sexo



4.5 Variaciones en función de la edad y el sexo

Considerando los grupos etarios establecidos inicialmente se describen las medianas y los rangos intercuartílicos RIC (percentil 25- percentil 75) en los grupos diferenciados por sexo. Los resultados se muestran a continuación en las respectivas tablas.

Tabla 23 Mediana y RIC que muestran diferencias en función del sexo y los diferentes grupos de edad

Niña/Adolescente	0-5 años	6-10 años	11-15 años	>15 años
Al (µg/g)	32.95(20.47-55.73)	26.21(17.25-30.71)	16.33(10.32-26.36)	12.30(6.75-26.20)
Fe (µg/g)	18.0(13.94-21.1)	18.13(15.01-21.47)	14.85(11.41-18.83)	14.00(9.50-19.75)
Se (µg/g)	0.40(0.30-0.60)	0.39(0.31-0.51)	0.50(0.311-1.032)	0.50(0.37-0.80)
Sr (µg/g)	0.89(0.38-1.57)	1.90(0.83-3.36)	2.45(1.13-4.26)	2.94(1.50-4.19)
Zn (µg/g)	56.57(38.66-91.50)	90.56(66.51-112.70)	128.8(99.0-158.2)	150.5(110.7-183.5)
Bi (µg/g)	0.03(0.013-0.090)	0.021(0.011-0.052)	0.011(0.006-0.028)	0.015(0.008-0.079)
Co (ng/g)	17.0(12.05-23.80-)	21.83(13.88-28.83)	19.06(11.65-38.82)	17.21(9.93-33.25)
Ni (µg/g)	0.85(0.57-1.25)	0.59(0.40-0.77)	0.500(0.301-0.869)	0.50(0.37-0.83)
Mn (ng/g)	309(208-410)	398(274-555)	350(236-502)	325(224-518)
Ag (ng/g)	344(199-719)	335(153-568)	224(125-477)	250(137-701)
Mo (µg/g)	0.075(0.060-0.093)	0.056(0.037-0.080)	0.030(0.023-0.045)	0.031(0.027-0.051)

Cd (ng/g)	23.68(12.09-37.37)	24.50(14.05-38.09)	21.32(10.81-33.69)	19.85(11.07-38.85)
As (µg/g)	0.065(0.032-0.097)	0.070(0.040-0.130)	0.080(0.042-0.135)	0.060(0.030-0.080)
Cr (µg/g)	0.40(0.35-0.61)	0.41(0.32-0.52)	0.30(0.21-0.39)	0.30(0.20-0.52)
Cu (µg/g)	19.30(12.70-36.05)	40.25(17.01-86.00)	34.50(14.86-75.66)	37.05(22.80-70.07)
Ba (µg/g)	0.50(0.30-0.70)	0.600(0.444-1.000)	0.679(0.343-1.000)	0.80(0.50-1.41)
Hg (µg/g)	0.830(0.430-2.075)	1.055(0.455-1.907)	1.015(0.693-1.657)	0.830(0.480-1.430)
Tl (ng/g)	0.390(0.200-0.500)	0.290(0.152-0.495)	0.119(0.080-0.270)	0.200(0.100-0.400)
Pb (µg/g)	0.88(0.67-2.20)	1.07(0.55-1.70)	0.54(0.30-1.10)	0.60(0.30-1.60)

Mediana y RIC: Rango Intercuartílico

Tabla 24 Mediana y RIC que muestran diferencias en función del sexo y los diferentes grupos de edad

Niño/Adolescente	0-5 años	6-10 años	11-15 años	>15 años
Al (µg/g)	22.0(10.6-33.6)	16.6(11.7-27.1)	20.0(13.5-29.0)	13.2(6.4-25.2)
Fe (µg/g)	16.6(12.2-25.7)	18.2(13.1-22.3)	14.8(11.5-19)	11.5(9.3-15.7)
Se (µg/g)	0.4(0.3-0.64)	0.42(0.28-0.57)	0.51(0.40-1.33)	0.6(0.36-1.1)
Sr (µg/g)	0.5(0.3-1.9)	0.57(0.23- 1.65)	0.55(0.35-1.18)	0.77(0.5-1.6)
Zn (µg/g)	76.9(47.6-104)	101(62.8-135)	137(108-152)	142(123-198)

Bi (µg/g)	0.02(0.01-0.03)	0.014(0.01-0.03)	0.01(0.004-0.02)	0.01(0.006-0.03)
Co (ng/g)	14(10.3-21.3)	11.2(7.8-17.7)	10.1 (7.5-14.6)	7.5(5.1-13.8)
Ni (µg/g)	0.7(0.40-1.22)	0.56(0.39-1.03)	0.41(0.25-0.7)	0.31(0.2-0.5)
Mn (ng/g)	301(165-553)	340(201-523)	307(192-476)	203(143-370)
Ag (ng/g)	290(163-516)	194(108-385)	97(51-184)	57(37-102)
Mo (µg/g)	0.07(0.05-0.09)	0.06(0.04-0.07)	0.03(0.02-0.05)	0.03(0.02-0.05)
Cd (ng/g)	22.0(15.0-37.5)	17.8(9.25-27.5)	12.0(7.1-24.3)	10.6(5.6-19.5)
As (µg/g)	0.06(0.03-0.10)	0.07(0.06-0.10)	0.06(0.04-0.09)	0.04(0.02-0.07)
Cr (µg/g)	0.40(0.33-0.66)	0.44(0.32-0.61)	0.31(0.24-0.44)	0.37(0.26-0.50)
Cu (µg/g)	15.3(10.5-22.4)	16.2(10.8-31.0)	15.2(9.1-32.2)	21.0 (12.6-37.5)
Ba (µg/g)	0.40(0.24-0.59)	0.30(0.21-0.67)	0.39(0.20-0.62)	0.37(0.20-0.60)
Hg (µg/g)	1.0(0.43-1.8)	0.98(0.44-1.89)	0.93(0.56-1.89)	0.95(0.48-1.69)
Tl (ng/g)	0.53(0.28-0.77)	0.44(0.30-0.78)	0.30(0.19-0.52)	0.30(0.20-0.45)
Pb (µg/g)	1.2(0.71-2.09)	0.75(0.45-1.30)	0.50(0.30-1.50)	0.40(0.30-0.60)

Mediana y RIC: Rango Intercuartílico

A continuación se observa el resultado del test de Mann-Whitney realizado para verificar si se encuentran diferencias significativas en los diferentes grupos de edad en función del sexo.

Los resultados se muestran en las tablas siguientes:

Considerando la tabla que se muestra a continuación se pueden objetivar las diferencias en el grupo de edad de 0-5 años

Tabla 25 Mediana y RIC que muestran diferencias en función del sexo y el grupo de edad 0-5 años

Niño/Niña	0-5 Niño	0-5 Niña	p	Diferencia
Al (µg/g)	22.0(10.6-33.6)	32.95(20.47-55.73)	0.034	10.95
Fe (µg/g)	16.6(12.2-25.7)	18.0(13.94-21.1)	0.772	
Se (µg/g)	0.4(0.3-0.64)	0.40(0.30-0.60)	0.612	
Sr (µg/g)	0.5(0.3-1.9)	0.89(0.38-1.57)	0.602	
Zn (µg/g)	76.9(47.6-104)	56.57(38.66-91.50)	0.160	
Bi (µg/g)	0.02(0.01-0.03)	0.03(0.013-0.090)	0.046	0.01
Co (ng/g)	14(10.3-21.3)	17.0(12.05-23.80-)	0.232	
Ni (µg/g)	0.7(0.40-1.22)	0.85(0.57-1.25)	0.245	

Mn (ng/g)	301(165-553)	309(208-410)	0.902	
Ag (ng/g)	290(163-516)	344(199-719)	0.298	
Mo (µg/g)	0.07(0.05-0.09)	0.075(0.060-0.093)	0.605	
Cd (ng/g)	22.0(15.0-37.5)	23.68(12.09-37.37)	0.850	
As (µg/g)	0.06(0.03-0.10)	0.065(0.032-0.097)	0.969	
Cr (µg/g)	0.40(0.33-0.66)	0.40(0.35-0.61)	0.662	
Cu (µg/g)	15.3(10.5-22.4)	19.30(12.70-36.05)	0.023	4
Ba (µg/g)	0.40(0.24-0.59)	0.50(0.30-0.70)	0.304	
Hg (µg/g)	1.0(0.43-1.8)	0.830(0.430-2.075)	0.763	
Tl (ng/g)	0.53(0.28-0.77)	0.39(0.20-0.50)	0.037	0.14
Pb (µg/g)	1.2(0.71-2.09)	0.88(0.67-2.20)	0.402	

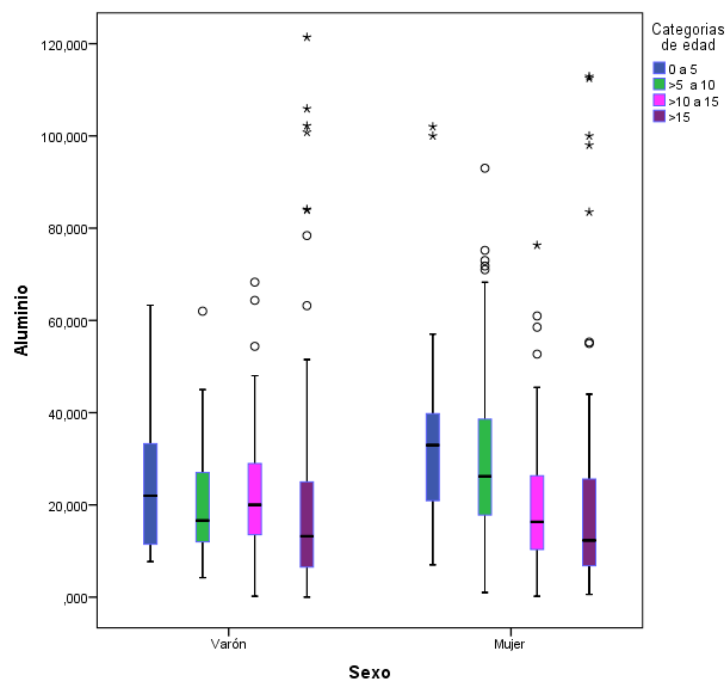
Mediana y RIC: Rango intercuartílico

Se observan diferencias en los elementos Al, Bi, Cu y Tl.

Un patrón similar a lo apreciado en la diferenciación inicial, realizada en función del sexo, se encuentra en los elementos mencionados. Así, en el Al, Bi y Cu los niveles en las niñas son superiores a los que aparecen en los niños. Se visualiza una mayor diferencia en el caso del Al donde las niñas presentan aproximadamente 10.95 µg/g más que los niños. En el caso del Cu y Bi las diferencias serían de 4 y 0.01 µg/g respectivamente

Sin embargo, el Tl manifiesta un comportamiento diferente dado que sus niveles son superiores en el grupo masculino, siendo esta diferencia de 0.14 ng/g.

Figura 28 Diagrama de cajas mostrando variación concentración de Al en función de la edad y el sexo



Siguiendo con los grupos etarios nos centraremos en el grupo de 6-10 años

Tabla 26 Mediana y RIC que muestran diferencias en función del sexo y el grupo de edad 6-10 años

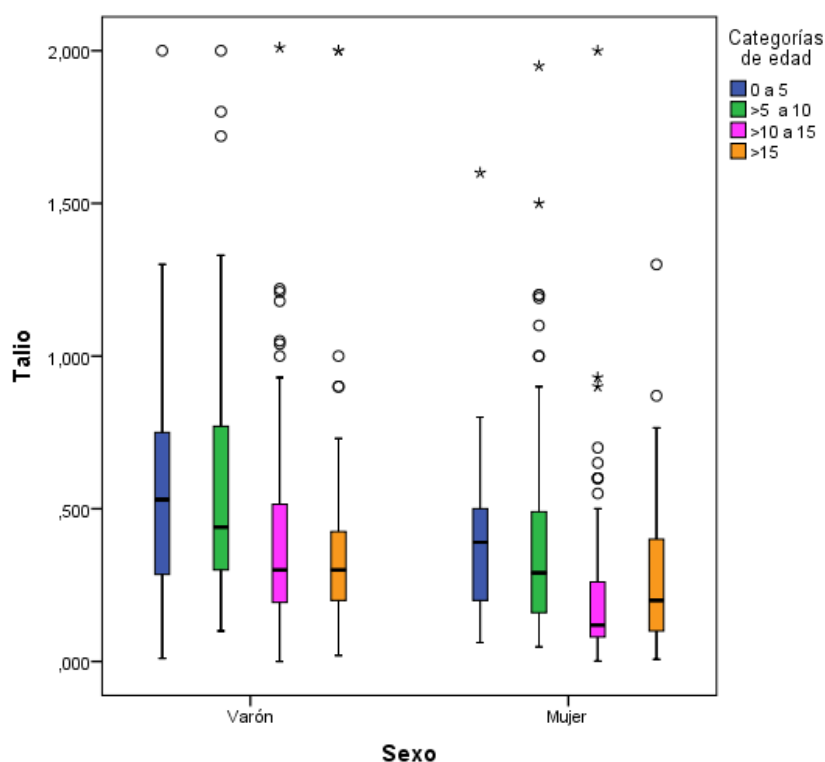
6-10 años	Niño	Niña	p	Diferencia
Al (µg/g)	16.6(11.7-27.1)	26.21(17.25-30.71)	<0.001	9.61
Fe (µg/g)	18.2(13.1-22.3)	18.13(15.01-21.47)	0.776	
Se (µg/g)	0.42(0.28-0.57)	0.39(0.31-0.51)	0.946	
Sr (µg/g)	0.57(0.23- 1.65)	1.90(0.83-3.36)	<0.001	1.33
Zn (µg/g)	101(62.8-135)	90.56(66.51-112.70)	0.319	

Bi (µg/g)	0.014(0.01-0.03)	0.021(0.011-0.052)	0.045	0.007
Co (ng/g)	11.2(7.8-17.7)	21.83(13.88-28.83)	<0.001	10.63
Ni (µg/g)	0.56(0.39-1.03)	0.59(0.40-0.77)	0.627	
Mn (ng/g)	340(201-523)	398(274-555)	0.112	
Ag (ng/g)	194(108-385)	335(153-568)	0.008	141
Mo (µg/g)	0.06(0.04-0.07)	0.056(0.037-0.080)	0.985	
Cd (ng/g)	17.8(9.25-27.5)	24.50(14.05-38.09)	0.032	6.7
As (µg/g)	0.07(0.06-0.10)	0.070(0.040-0.130)	0.240	
Cr (µg/g)	0.44(0.32-0.61)	0.41(0.32-0.52)	0.524	
Cu (µg/g)	16.2(10.8-31.0)	40.25(17.01-86.00)	<0.001	24.05
Ba (µg/g)	0.30(0.21-0.67)	0.600(0.444-1.000)	<0.001	0.3
Hg (µg/g)	0.98(0.44-1.89)	1.055(0.455-1.907)	0.370	
Tl (ng/g)	0.44(0.30-0.78)	0.290(0.152-0.495)	<0.001	0.15
Pb (µg/g)	0.75(0.45-1.30)	1.07(0.55-1.70)	0.101	

Mediana y RIC: Rango intercuartílico

Se observa que continúa manteniéndose un patrón similar al indicado anteriormente dado que, los niveles de la mayoría de elementos son manifiestamente superiores en las niñas, exceptuando el caso del Tl donde se observan concentraciones superiores en los niños.

Figura 29 Diagrama de cajas variación concentración de Tl en función de edad y sexo



Se pone de manifiesto una aproximación a lo evidenciado a nivel general. Por lo tanto, se observa un incremento en el número de elementos que muestran diferencias, pasando de ser 4 en el grupo etario anterior (0-5 años) a 9 en este grupo. Estos elementos son Al, Sr, Bi, Co, Ag, Cd, Cu, Ba y Tl.

Asimismo, se observa que la diferencia niña - niño para algunos elementos, véase el caso del Cu, Ba, Ag y Co, llega a ser casi el doble para un grupo respecto al otro.

Continuando con la diferenciación por grupos de edad y sexo veremos seguidamente la tabla que representa las variaciones existentes en el grupo 10-15 años

Tabla 27 Mediana y RIC que muestran diferencias en función del sexo y el grupo de edad 10-15 años

11-15 años	Niño	Niña	p	Diferencia
Al (µg/g)	20.0(13.5-29.0)	16.33(10.32-26.36)	0.076	
Fe (µg/g)	14.8(11.5-19)	14.85(11.41-18.83)	0.666	
Se (µg/g)	0.51(0.40-1.33)	0.50(0.311-1.032)	0.228	
Sr (µg/g)	0.55(0.35-1.18)	2.45(1.13-4.26)	<0.001	1.9
Zn (µg/g)	137(108-152)	128.8(99.0-158.2)	0.401	
Bi (µg/g)	0.01(0.004-0.02)	0.011(0.006-0.028)	0.079	
Co (ng/g)	10.1 (7.5-14.6)	19.06(11.65-38.82)	<0.001	9.5
Ni (µg/g)	0.41(0.25-0.7)	0.500(0.301-0.869)	0.183	
Mn (ng/g)	307(192-476)	350(236-502)	0.218	
Ag (ng/g)	97(51-184)	224(125-477)	<0.001	127
Mo (µg/g)	0.03(0.02-0.05)	0.030(0.023-0.045)	0.069	
Cd (ng/g)	12.0(7.1-24.3)	21.32(10.81-33.69)	0.004	9.32
As (µg/g)	0.06(0.04-0.09)	0.080(0.042-0.135)	0.015	0.02
Cr (µg/g)	0.31(0.24-0.44)	0.30(0.21-0.39)	0.112	
Cu (µg/g)	15.2(9.1-32.2)	34.50(14.86-75.66)	<0.001	19.3
Ba (µg/g)	0.39(0.20-0.62)	0.679(0.343-1.000)	<0.001	0.289

Hg (µg/g)	0.93(0.56-1.89)	1.015(0.693-1.657)	0.739	
Tl (ng/g)	0.30(0.19-0.52)	0.119(0.080-0.270)	<0.001	0.181
Pb (µg/g)	0.50(0.30-1.50)	0.54(0.30-1.10)	0.92	

Mediana y RIC: Rango intercuartílico

De nuevo se mantiene el mismo patrón indicado anteriormente dado que los niveles de la mayoría de elementos son manifiestamente superiores en las niñas, exceptuando el caso del Tl donde se observan concentraciones superiores en los niños.

Además, aparecen el As y Bi mostrando diferencias y desaparece respecto al anterior grupo el Al.

Por otro lado, se observa que la diferencia niña - niño para algunos elementos, véase el caso del Sr, Co, Ag, Cd, Cu, Ba y Tl, llega a ser casi del doble para un grupo respecto del otro.

Finalmente, respecto al último grupo etario de > 15 años podemos estudiar las diferencias que quedan reflejadas en la siguiente tabla

Tabla 28 Mediana y RIC que muestran diferencias en función del sexo y el grupo de edad mayores de 15 años

Mayor 15 años	Niño	Niña	p	Diferencia
Al (µg/g)	13.2(6.4-25.2)	12.30(6.75-26.20)	0.961	
Fe (µg/g)	11.5(9.3-15.7)	14.00(9.50-19.75)	0.133	
Se (µg/g)	0.6(0.36-1.1)	0.50(0.37-0.80)	0.390	

Sr (µg/g)	0.77(0.5-1.6)	2.94(1.50-4.19)	<0.001	2.17
Zn (µg/g)	142(123-198)	150.5(110.7-183.5)	0.991	
Bi (µg/g)	0.01(0.006-0.03)	0.015(0.008-0.079)	0.031	0.005
Co (ng/g)	7.5(5.1-13.8)	17.21(9.93-33.25)	<0.001	9.71
Ni (µg/g)	0.31(0.2-0.5)	0.50(0.37-0.83)	<0.001	0.19
Mn (ng/g)	203(143-370)	325(224-518)	<0.001	122
Ag (ng/g)	57(37-102)	250(137-701)	<0.001	193
Mo (µg/g)	0.03(0.02-0.05)	0.031(0.027-0.051)	0.782	
Cd (ng/g)	10.6(5.6-19.5)	19.85(11.07-38.85)	<0.001	9.25
As (µg/g)	0.04(0.02-0.07)	0.060(0.030-0.080)	0.183	
Cr (µg/g)	0.37(0.26-0.50)	0.30(0.20-0.52)	0.105	
Cu (µg/g)	21.0 (12.6-37.5)	37.05(22.80-70.07)	<0.001	16.05
Ba (µg/g)	0.37(0.20-0.60)	0.80(0.50-1.41)	<0.001	0.43
Hg (µg/g)	0.95(0.48-1.69)	0.830(0.480-1.430)	0.265	
Tl (ng/g)	0.30(0.20-0.45)	0.20(0.10-0.40)	0.007	0.1
Pb (µg/g)	0.40(0.30-0.60)	0.60(0.30-1.60)	0.007	0.2

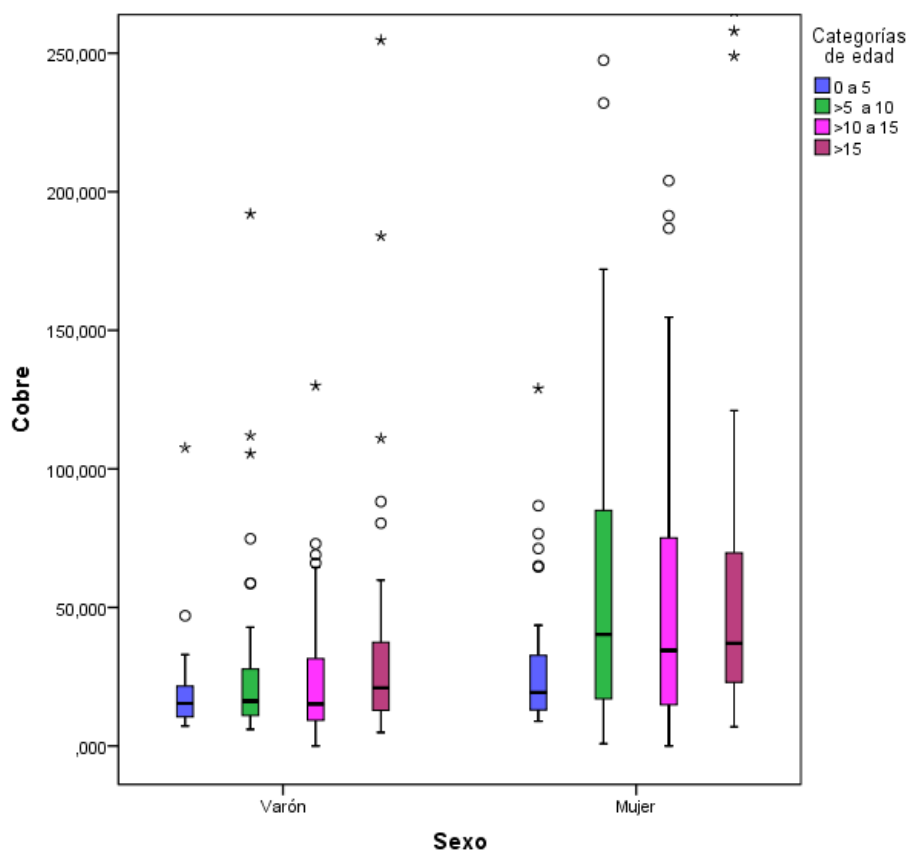
Mediana y RIC: Rango intercuartílico

Se confirma que se mantiene en todos los grupos etarios el mismo patrón indicado anteriormente, siendo más elevados los niveles de la mayoría de elementos en las niñas, exceptuando el caso del Tl donde se manifiesta lo opuesto, superiores concentraciones en los niños respecto a las niñas.

De nuevo, se incorporan mostrando diferencias en este grupo respecto al anterior el Ni, Mn y Pb y desaparece del mismo el As.

Asimismo, se observa al igual que en grupos anteriores que la diferencia niña - niño para algunos elementos, véase el caso del Co, Cd y Cu, llega a ser casi el doble en un grupo respecto del otro. Mientras que para los elementos Sr, Ag y Ba, estas diferencias llegan a ser más del doble entre ambos sexos. Merece la pena destacar que dos elementos Cu y Tl mantienen diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos etarios. En la siguiente representación gráfica queda constancia del hecho expuesto.

Figura 30 Diagrama de cajas mostrando variación concentración de Cu en función de la edad y el sexo



Por otra parte, mientras que en el grupo de edad 0-5 años únicamente se manifiesta variación varón – hembra en tres elementos, a partir de los 6 años se triplican las diferencias y permanecen en el tiempo.

4.6 Variaciones en grupos etarios diferentes en función del sexo

Considerando que el tamaño muestral de nuestra población era elevado se decide categorizar de nuevo el grupo edad, estableciéndose nuevos grupos etarios a fin de comparar con las referencias bibliográficas existentes.

De este modo se crean 18 nuevas categorías por grupos de edad. Todas ellas quedan representadas en las siguientes tablas. En éstas, se pueden observar aquellos elementos en los que aparecen diferencias estadísticamente significativa entre sexos con un valor $p < 0.05$.

Tabla 29 Representación de las diferencias entre los grupos de 0-1 hasta 4-5 años, en función del sexo

Niño/Niña	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5
Al (µg/g)	1.0	1.0	0.592	0.370	0.695
Fe (µg/g)	1.0	0.545	1.0	0.650	1.0

Se (µg/g)	1.0	0.61	0.132	1.0	0.047
Sr (µg/g)	0.4	1.0	1.0	0.370	1.0
Zn (µg/g)	1.0	1.0	1.0	0.650	0.238
Bi (µg/g)	1.0	0.545	1.0	0.370	0.267
Co (ng/g)	1.0	1.0	0.347	0.650	0.238
Ni (µg/g)	1.0	1.0	0.315	1.0	0.267
Mn (ng/g)	1.0	1.0	1.0	0.650	1.0
Ag (ng/g)	1.0	0.545	0.315	0.170	0.62
Mo (µg/g)	1.0	1.0	0.315	0.370	1.0
Cd (ng/g)	1.0	0.545	1.0	0.170	0.695
As (µg/g)	1.0	1.0	1.0	1.0	0.695
Cr (µg/g)	0.4	1.0	1.0	1.0	0.453
Cu (µg/g)	1.0	0.545	1.0	1.0	0.428
Ba (µg/g)	1.0	0.576	0.347	0.377	0.130
Hg (µg/g)	1.0	1.0	0.637	1.0	0.220
Tl (ng/g)	0.4	0.576	1.0	0.170	0.695
Pb (µg/g)	0.4	0.222	0.335	0.170	0.695
P<0.05					

Prácticamente no aparecen diferencias de 0 a 5 años en función del sexo. Únicamente, en el Se, se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre niños y niñas (p : 0.047) en la categoría de 4-5 años de una población de n : 26

Tabla 30 Representación de las diferencias entre los grupos de 5-6 hasta 10-11 años, en función del sexo

	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11
Al ($\mu\text{g/g}$)	0.02	0.183	0.07	1.0	1.0	1.0
Fe ($\mu\text{g/g}$)	1.0	1.0	1.0	1.0	0.374	1.0
Se ($\mu\text{g/g}$)	0.695	0.387	1.0	0.704	0.75	0.127
Sr ($\mu\text{g/g}$)	0.128	0.024	1.0	0.449	0.374	0.000
Zn ($\mu\text{g/g}$)	1.0	0.08	0.370	0.128	0.374	0.022
Bi ($\mu\text{g/g}$)	1.0	0.659	1.0	0.021	1.0	0.446
Co (ng/g)	1.0	0.024	0.370	0.002	0.374	0.127
Ni ($\mu\text{g/g}$)	0.449	0.659	0.370	1.0	0.540	0.599
Mn (ng/g)	0.449	0.659	0.07	0.128	0.302	0.446
Ag (ng/g)	0.449	0.659	0.370	0.449	1.0	0.127
Mo ($\mu\text{g/g}$)	1.0	0.085	1.0	1.0	0.467	0.077
Cd (ng/g)	0.449	0.183	0.370	1.0	1.0	1.0
As ($\mu\text{g/g}$)	1.0	1.0	0.175	0.449	1.0	0.127

Cr (µg/g)	1.0	1.0	1.0	1.0	0.888	0.316
Cu (µg/g)	1.0	0.183	0.370	0.449	0.008	0.002
Ba (µg/g)	0.128	0.183	0.092	0.128	0.888	0.127
Hg (µg/g)	1.0	1.0	0.656	0.670	0.413	0.633
Tl (ng/g)	0.706	1.0	1.0	0.449	0.075	0.022
Pb (µg/g)	0.128	0.659	1.0	0.449	0.374	0.127

P<0.05

En la franja de edad entre 5 y 10 años, progresivamente comienzan a hacerse visibles las diferencias. Esto queda de manifiesto en la tabla anterior. Así, en el grupo 5-6 años únicamente muestra diferencias niño-niña el Al. En la categoría 6-7 años aparecen diferencias en el Sr y Co. Sin embargo, en la categoría 7-8 años no se encuentran diferencias varón-hembra en ningún elemento.

Asimismo, en la categoría 8-9 años manifiestan diferencias los elementos Bi y Co. En el grupo 9-10 años aparecen diferencias únicamente en el Cu. Por último, en la categoría 10-11 años se incrementan las diferencias mostrándose éstas en el Sr, Zn, Cu y Tl.

Tabla 31 Representación de las diferencias entre los grupos de 11-12 hasta mayores de 16 años, en función del sexo

	11-12	12-13	13-14	14-15	15-16	>16
Al (µg/g)	0.449	1.0	0.021	0.085	0.156	0.692
Fe (µg/g)	1.0	0.385	0.867	0.234	0.011	0.418

Se (µg/g)	1.0	1.0	0.729	0.503	0.982	0.489
Sr (µg/g)	0.000	0.006	0.061	0.012	0.000	0.000
Zn (µg/g)	0.449	0.678	0.124	0.085	0.395	0.418
Bi (µg/g)	1.0	0.077	0.947	0.012	0.309	0.021
Co (ng/g)	0.128	0.006	0.061	0.012	0.047	0.000
Ni (µg/g)	0.7	0.385	0.867	0.896	0.004	0.001
Mn (ng/g)	0.128	0.385	0.688	0.047	0.003	0.001
Ag (ng/g)	0.128	0.006	0.061	0.000	0.000	0.000
Mo (µg/g)	0.445	1.0	0.304	0.085	0.908	0.841
Cd (ng/g)	0.449	0.006	0.867	0.181	0.047	0.002
As (µg/g)	1.0	1.0	0.774	0.250	0.042	0.590
Cr (µg/g)	0.705	0.385	0.891	0.359	0.395	0.551
Cu (µg/g)	0.128	0.77	0.192	0.144	0.047	0.016
Ba (µg/g)	0.449	0.385	0.461	0.012	0.000	0.000
Hg (µg/g)	1.0	1.0	0.116	0.571	0.537	0.633
Tl (ng/g)	0.128	0.378	0.007	0.018	0.555	0.002
Pb (µg/g)	1.0	1.0	0.615	0.509	0.156	0.037

P<0.05

Paulatinamente, desde los 11 hasta los 16 años se han ido haciendo más visibles los cambios en función del sexo, quedando de manifiesto en la tabla expuesta anteriormente. Así, en el grupo 11-12 años únicamente muestra diferencias niño-niña el Sr. En la categoría 12-13 años aparecen diferencias en el Sr, Co, Ag y Cd. Sin embargo, en la categoría 13-14 años vuelven a apreciarse menor número de diferencias varón- hembra, únicamente en los elementos Al y Tl.

En esa misma línea, a partir de los 14 años parece mostrarse un gran cambio varón-hembra objetivable en el aumento del número de elementos que se manifiestan diferentes en ambos sexos. En este sentido, en la categoría 14-15 años muestran diferencias 7 elementos Sr, Bi, Co, Mn, Ag, Ba y Tl. En el grupo 15-16 años aparecen nuevas diferencias, incrementándose este número hasta 10, en los siguientes elementos Fe, Sr, Co, Ni, Mn, Ag, Cd, As, Cu y Ba.

Finalmente, en la categoría de los mayores de 16 años las diferencias son aún más significativas que en los intervalos de edad anteriores. Posiblemente los resultados de este grupo sean compatibles con los resultados de un grupo de adultos. El número de elementos en los que es palpable diferencia entre sexos es 11, siendo éstos el Sr, Bi, Co, Ni, Mn, Ag, Cd, Cu, Ba, Tl y Pb.

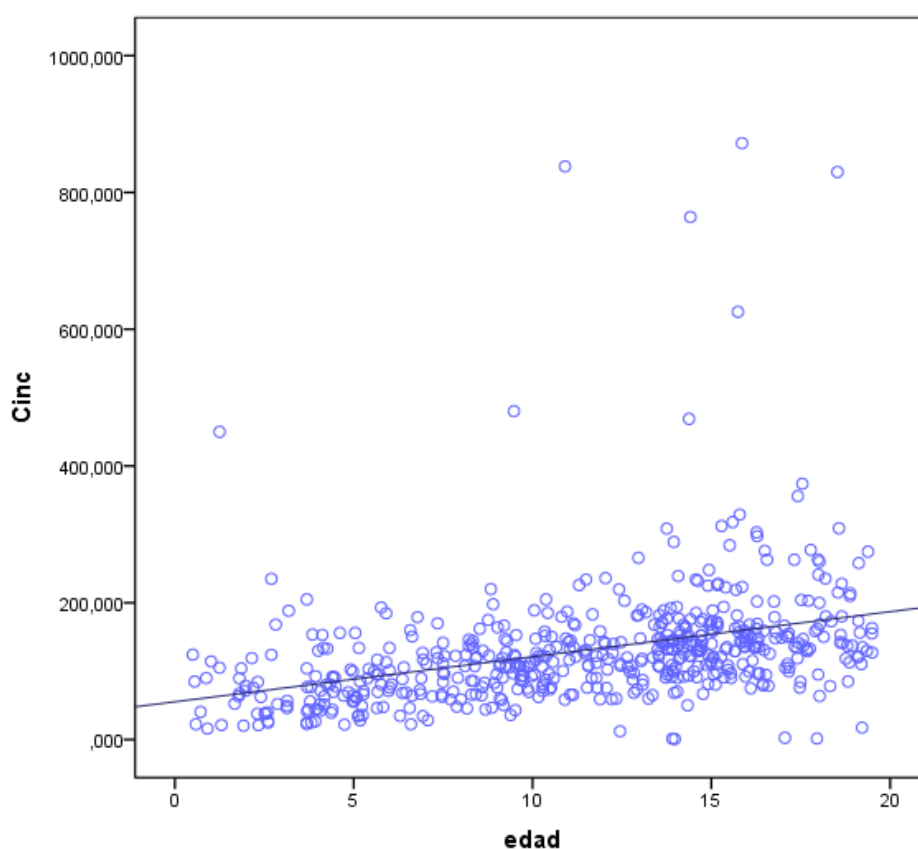
4.7 Estudios de correlación

Se estudió la asociación entre variables mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

El punto de partida fue el estudio de la relación entre la variable independiente edad y las variables dependientes cuantitativas elementos traza.

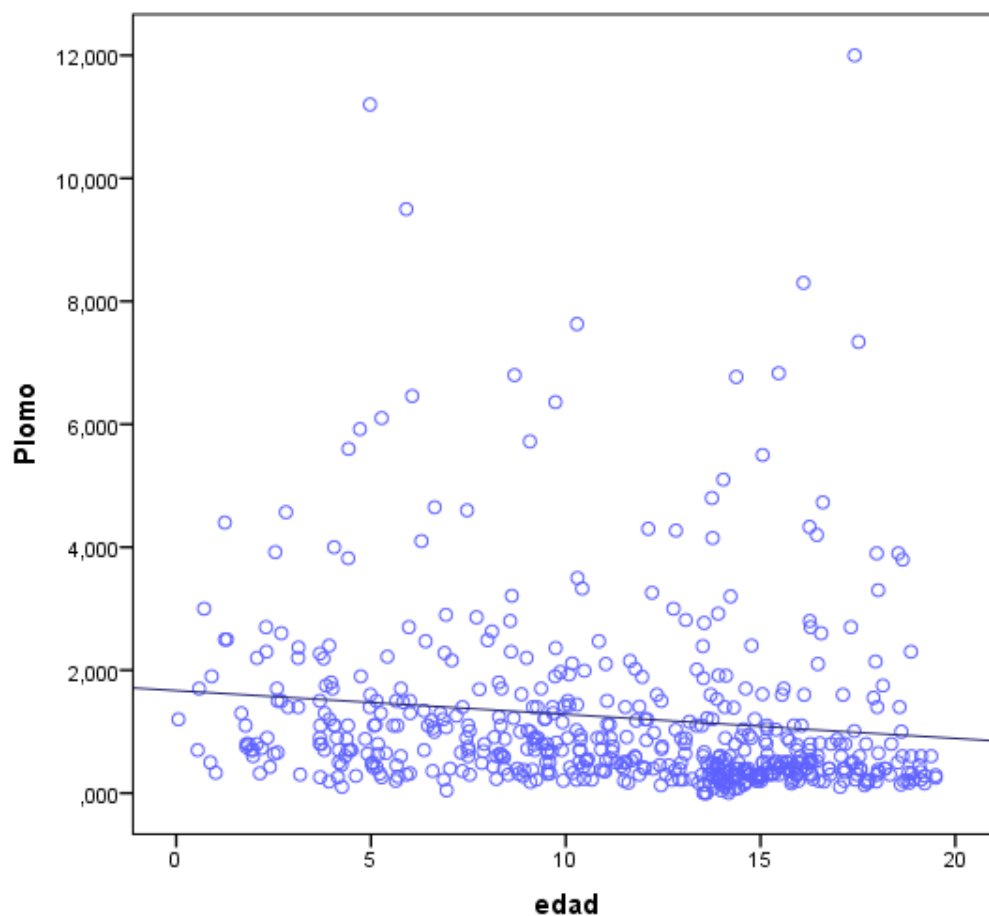
En el mismo queda reflejado una relación positiva con la edad en las variables Se, Sr, Ba y Zn. En las tres primeras la relación es débilmente positiva y en el caso del Zn la relación se manifiesta algo más fuerte como queda reflejado en la siguiente gráfica (R^2 : 0.359, $p < 0.001$)

Figura 31 Correlación entre las variables Zn y edad.



Del mismo modo, se observa una relación negativa con la edad para las variables Cd, Al, Fe, Bi, Co, Ni, Mn, Ag, Mo, As, Cr, Tl y Pb. Esto se puede visualizar seguidamente en el caso del Pb (R^2 : -0.309, $p < 0.001$) en la gráfica que se muestra a continuación.

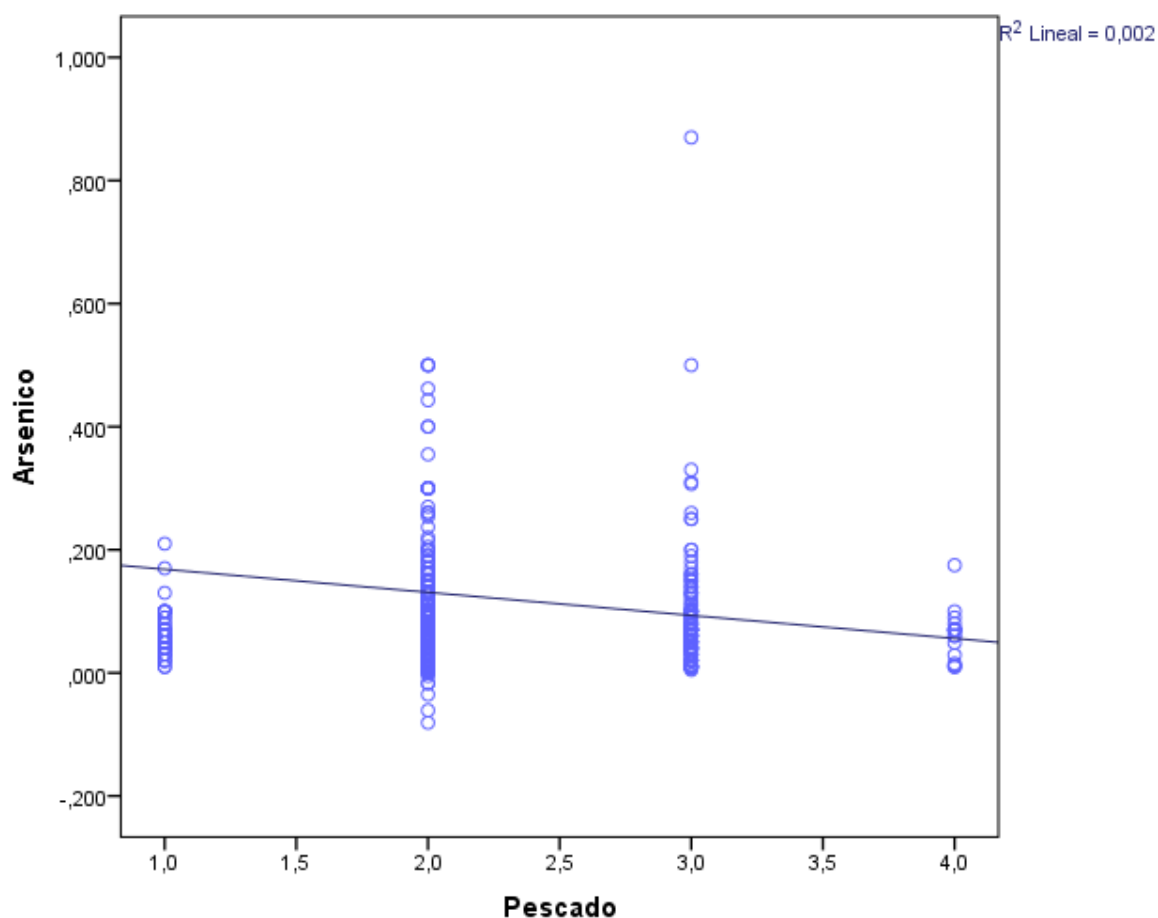
Figura 32 Correlación entre las variables Pb y edad.



Por último, en el caso del Cu no se ha encontrado ningún tipo de correlación con la edad.

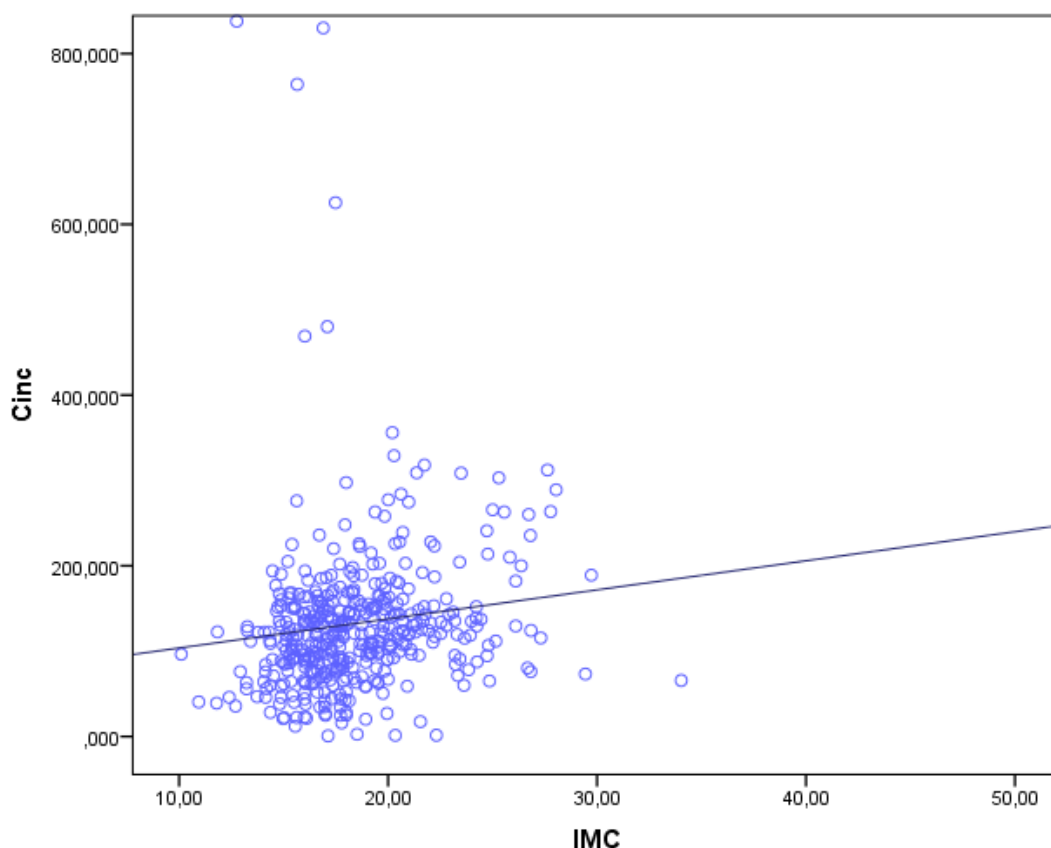
Asimismo, considerando la presencia de As en el pescado se estudio la posible relación de estas 2 variables. El resultado de la correlación fue prácticamente inexistente (R^2 : 0.002) y dado que, el As del pescado es fundamentalmente orgánico mientras que el As del cabello es eminentemente inorgánico se puede inferir que este resultado es acorde a la situación de As.

Figura 33 Correlación entre las variables As y frecuencia de consumo de pescado



Por otro lado y para finalizar con el estudio de relaciones con variables independientes, se ha querido estudiar la correlación Zn, IMC(Índice de masa corporal) dado que aparece frecuentemente descrita en la bibliografía. Ésta, como se pone de manifiesto en la gráfica es una correlación débilmente positiva (R^2 : 0.262, $p < 0.001$)

Figura 34 Correlación entre las variables Zn e IMC.



Posteriormente, el siguiente objetivo fue el estudio de las relaciones entre elementos. Para ello, partiendo de lo que describe la literatura científica se inició la búsqueda de las diferentes relaciones entre elementos nutricionales y elementos tóxicos.

En este sentido, las correlaciones positivas entre elementos nutricionales se pueden observar en las tablas que se muestran a continuación.

En general, la mayoría de las correlaciones son débilmente positivas excepto en el caso de la relación Cr-Fe que reflejó un coeficiente de correlación R^2 : 0.623 y la relación Cr-Co con un coeficiente de correlación R^2 : 0.623, ambos con una significación estadística $p < 0.001$.

Figura 35 Correlación entre las variables Cromo y Hierro

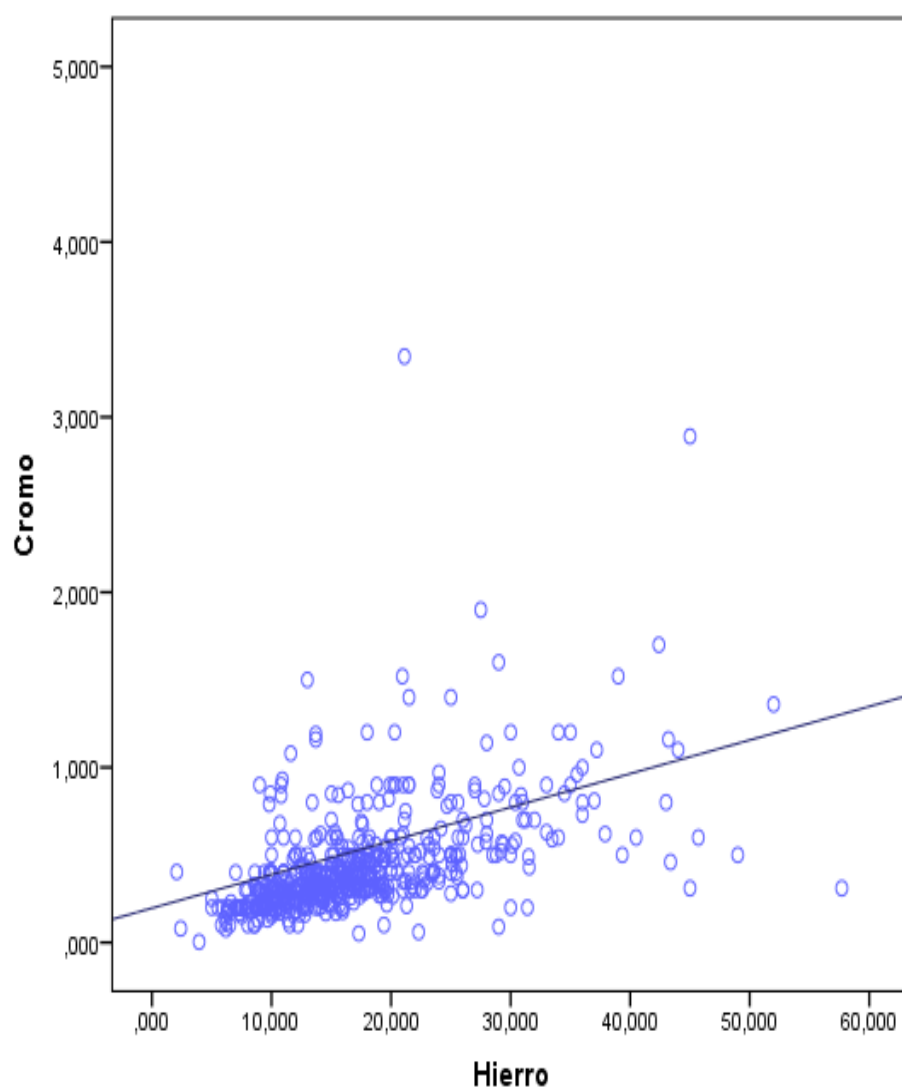


Tabla 32 Correlaciones positivas entre elementos nutricionales

	Co	Ni	Cr	Cu	Fe
Fe	0.421	0.400	0.623		

Co	0.445	0.445	0.421
Ni	0.445		0.223
Cr	0.623		

P<0.001

En el caso de la siguiente tabla se visualizan unas correlaciones débilmente positivas entre los elementos esenciales Zn, Cu y Se

Tabla 33 Correlaciones positivas entre los elementos esenciales Zn, Cu y Se

	Se	Zn	Cu
Se		0.278	
Zn	0.278		0.131
Cu		0.131	

P<0.001

Asimismo, se estudiaron las posibles relaciones entre los elementos tóxicos. Únicamente comentaremos aquellas que, mencionadas en la bibliografía, se mostraron más significativas.

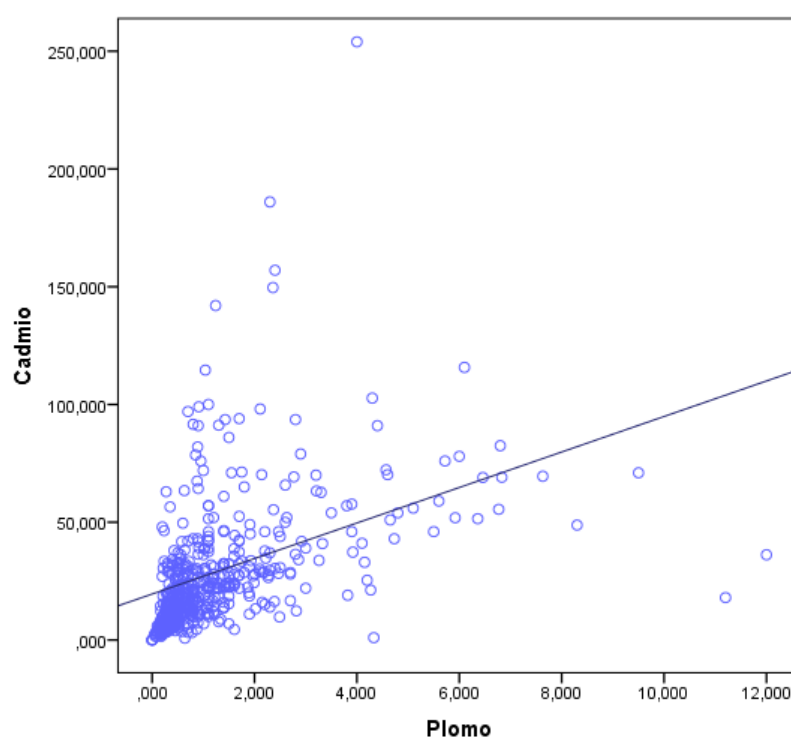
Tabla 34 Correlaciones entre los elementos tóxicos.

	Cd	Mn	Tl	Pb
Cd		0.458	0.246	0.682
Mn	0.458		0.147	0.371
Tl	0.246	0.147		0.370
Pb	0.682	0.371	0.370	—

P<0.001

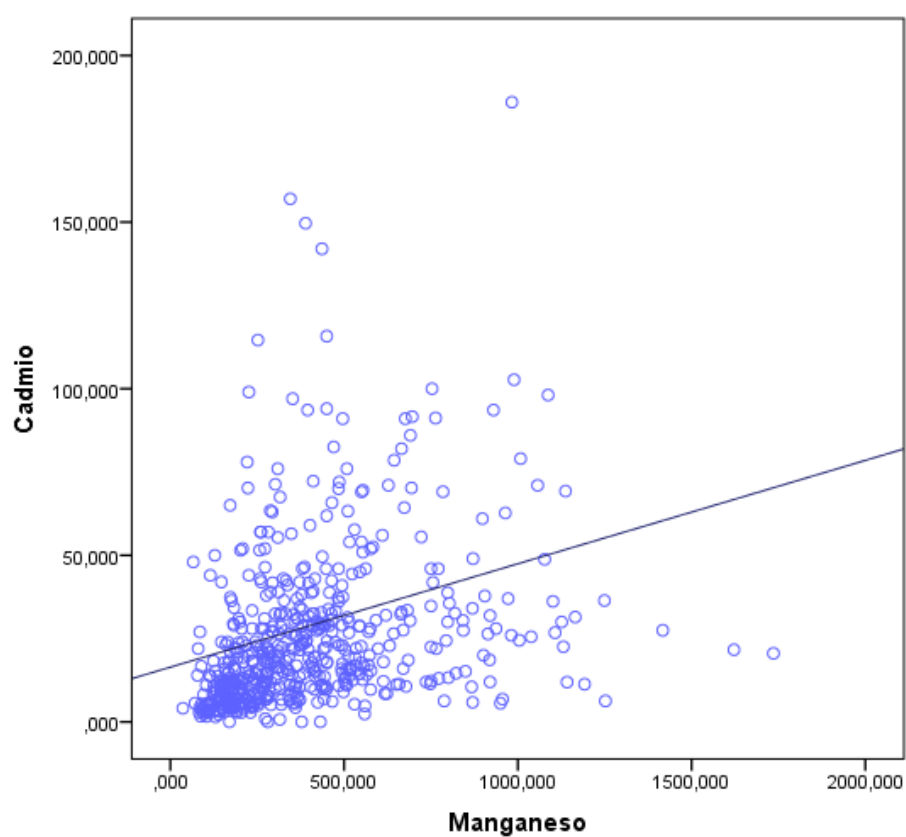
La relación entre Cd y Pb queda claramente establecida en un sentido positivo. Ambos elementos van de la mano en un sentido ascendente (R^2 : 0.682, $p < 0.001$)

Figura 36 Correlaciones entre los elementos tóxicos Cd y Pb



La relación entre el Cd y Mn (R^2 : 0.458, $p < 0.001$) aunque también es rigurosamente positiva no manifiesta la misma fuerza que la relación vista anteriormente entre Cd y Pb

Figura 37 Correlación entre los elementos tóxicos Cd y Mn



Finalmente, se estudiarán las posibles relaciones entre los elementos nutricionales y tóxicos.

Tabla 35 Correlaciones entre elementos nutricionales y tóxicos.

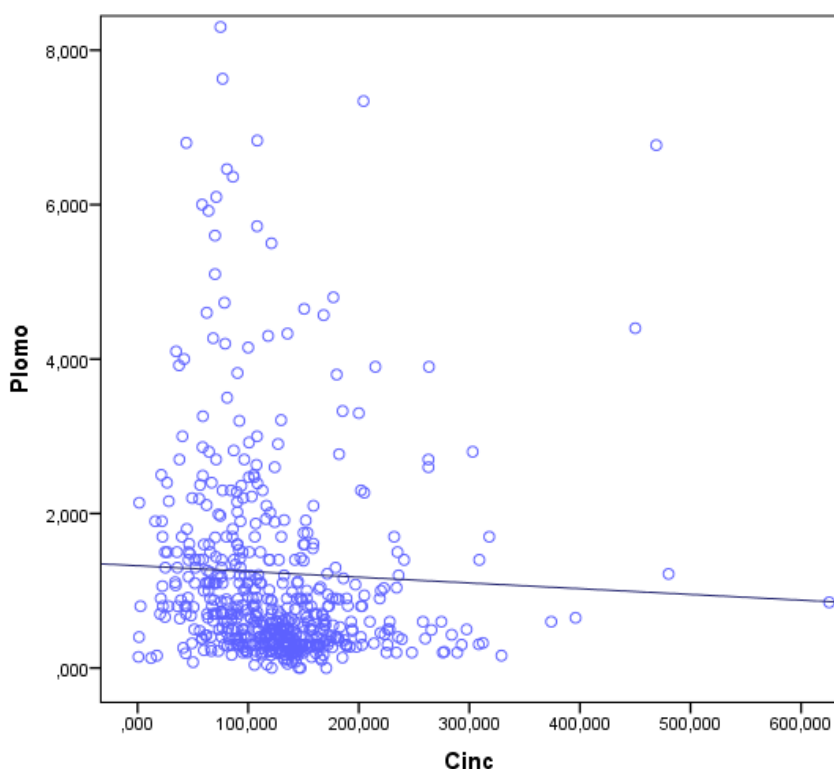
	Cd	Tl	Pb	Bi	Al
Se		-0.129	-0.081		
Zn	-0.088	-0.135	-0.271	-0.172	-0.127
Cu		-0.134			

P<0.001

Merecen especial consideración las correlaciones negativas entre elementos nutricionales y tóxicos. Desde este planteamiento se han encontrado las relaciones objetivables en la tabla reflejada anteriormente. Todas estas correlaciones se han puesto de manifiesto de forma débil.

La correlación inversa entre Pb y Zn se visualiza gráficamente a continuación

Figura 38 Correlación inversa entre Pb y Zn



4.8 Estudios de prevalencia

En un estudio descriptivo trasversal se pueden establecer las Razones de Prevalencia “RP” y los Factores de Protección “FP” empleando unos niveles de corte previamente establecidos. En éste, se ha considerado utilizar para el estudio del Pb los límites de seguridad que determinan un punto de corte en 9 µg/g, que fueron recomendados por diferentes investigadores soviéticos y avalados por el CDC de Estados Unidos ^{81,174,237}

Antes de iniciar el estudio estadístico inferencial se procedió a establecer 2 nuevas categorías de edad. De este modo, surgieron los grupos de niños menores o igual a 10 años y los mayores de 10 años. Esto se realizó a fin de poder emplear unas tablas de contingencia y comenzar el análisis univariado.

A partir de este momento se llevó a cabo un test de Mann-Whitney para confirmar que aparecía diferencia significativa entre ambos grupos en relación al Pb

En este sentido, se obtuvieron los siguientes resultados

Tabla 36 Análisis univariado para los grupos de edad menores y mayores de 10 años asociados a concentraciones de Pb en cabello $\geq 9 \mu\text{g/g}$

	N	%Pb $\geq 9 \mu\text{g/g}$	RP	95%	IC
Niños menores o iguales a 10 años	214	0.9 %	1		
Niños mayores de 10 años	342	0.9 %	1,065	(0.179 - 6.324)	0.945
Total	556				

Así, se puede objetivar que en función de las nuevas categorías de edad (p : 0.945) y los límites de seguridad recomendados, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

Sin embargo, merece la pena significar aquellos casos que han aparecido en nuestra población con niveles que superan los $9 \mu\text{g/g}$. Así, se han encontrado cinco individuos. Un niño de 6 años con un valor de $9.5 \mu\text{g/g}$, una niña de 5 años con un valor de $11.2 \mu\text{g/g}$, una adolescente de 17 años con un valor de $12 \mu\text{g/g}$, otra niña de 12 años con un valor de $13.9 \mu\text{g/g}$ y finalmente, un adolescente de 14 años con un valor de $19.4 \mu\text{g/g}$.

4.9 Estudio del Hg.

4.9.1 Variación en función de la edad

Inicialmente se estableció la mediana y los diferentes percentiles que se muestran a continuación

Tabla 37 Concentración de Hg en cabello en la población estudiada

	LC	5	10	25	50	75	90	95	97.5	Min	Max
Hg (µg/g)	0.008	0.13	0.26	0.53	0.97	1.73	2.69	3.95	5.56	0.01	10.89

LC: Límite de Cuantificación Percentiles (5,10,25,50,75,90,95,97.5) Min: valor Mínimo Max: Valor Máximo

Tabla 38 Concentración de Hg en cabello expresada como Media Aritmética, Mediana y sus Valores de Referencia

	Intervalo de referencia			
	Media	Mediana	Percentil 5	Percentil 95
Hg (µg/g)	1.37	0.97	0.13	3.95

A diferencia de la mayoría de los elementos traza el Hg no sigue el patrón habitual dado que no muestra diferencias significativas en función de la edad.

Tabla 39 Diferenciación de la concentración de Hg en función de los grupos de edad

Elemento traza	0-5 años	6-10 años	11-15 años	>15 años	p
Hg (µg/g)	0.90(0.43-1.90)	1.02(0.46-1.89)	0.98(0.62-1.70)	0.86(0.48-1.56)	0.535

Mediana y RIC: Rango intercuartílico

4.9.2 Variaciones del Hg en función del sexo y los grupos etarios

Se ha utilizado el test de Mann-Whitney para apreciar las posibles diferencias en función del sexo (varón – hembra).

A continuación, se visualizan la mediana junto con su rango intercuartílico RIC (percentil 25 - percentil 75) y se pueden observar que no aparece diferencia estadísticamente significativa entre sexos objetivable con un valor $p < 0.05$.

Tabla 40 Diferenciación de la concentración de Hg en función del sexo

Elemento traza	<i>varón</i>	<i>hembra</i>	p
Hg (µg/g)	0.97(0.53-1.85)	0.97(0.54-1.71)	0.877

Mediana y RIC: Rango intercuartílico

Asimismo, no se encuentra diferencia en función del sexo y los grupos etarios.

Tabla 41 Diferenciación de la concentración de Hg en función del sexo y los grupos de edad

Niño/Adolescente	0-5 años	6-10 años	11-15 años	>15 años
Hg (µg/g)	1.0(0.43-1.8)	0.98(0.44-1.89)	0.93(0.56-1.89)	0.95(0.48-1.69)

Mediana y RIC: Rango intercuartílico

Tabla 42 Diferenciación de la concentración de Hg en función del sexo y los grupos de edad

Niña/Adolescente	0-5 años	6-10 años	11-15 años	>15 años
Hg (µg/g)	0.830(0.430-2.075)	1.055(0.455-1.907)	1.015(0.693-1.657)	0.830(0.480-1.430)

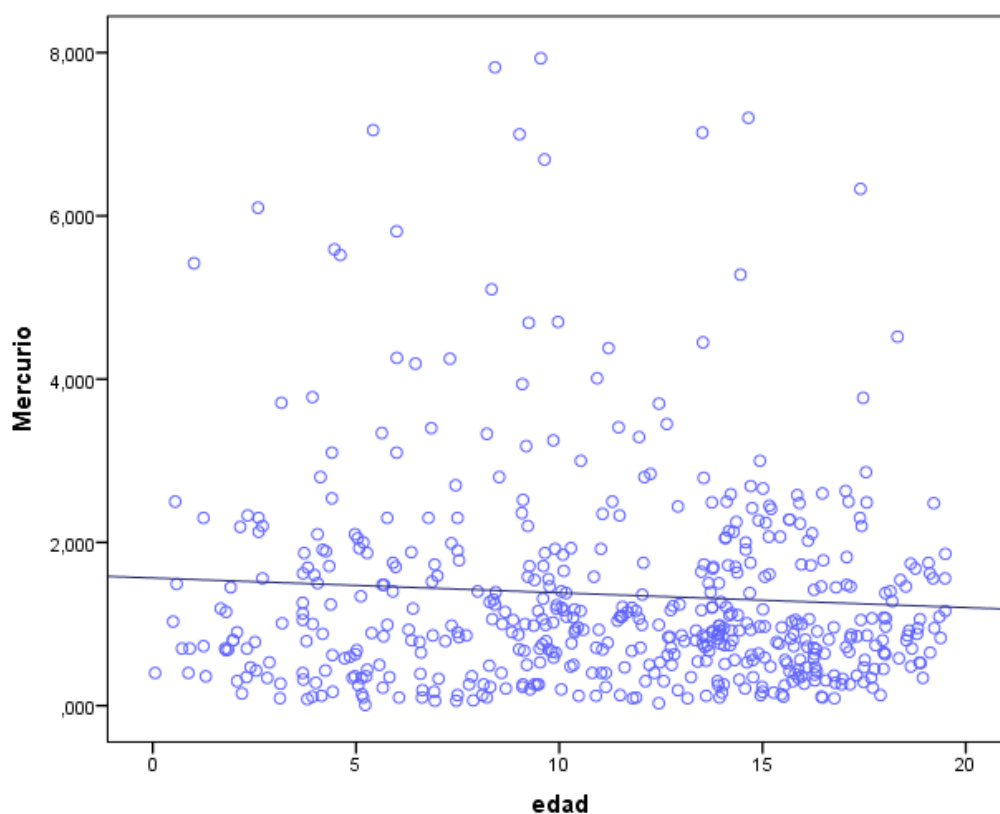
Mediana y RIC: Rango intercuartílico

4.9.3 Estudio de Correlaciones

La asociación entre variables se estudia mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Inicialmente se comenzó viendo la posible relación entre la variable dependiente cuantitativa Hg y las independientes edad y sexo. En ambos casos se verifica que no se encuentra relación del Hg en función de la edad ni tampoco en función del sexo.

Figura 39 Correlación entre las variables Hg y edad.



Seguidamente, se estudiaron posibles correlaciones con otros elementos traza. En este sentido, en la búsqueda de éstas con elementos traza esenciales se encontró una correlación débil e inversa entre el Hg y el Fe. (R^2 : -0.137, $p < 0.001$) e incluso otra muy débilmente negativa entre el Hg y el Cr (R^2 : -0.096, $p < 0.03$). Sin embargo, no se encontraron relaciones con elementos tóxicos.

Figura 40 Correlación entre las variables Mercurio y Hierro.

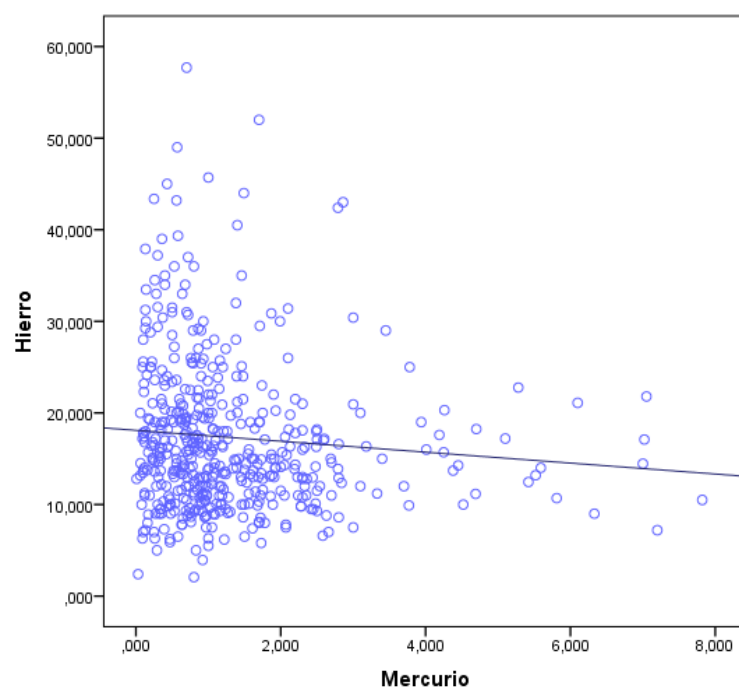
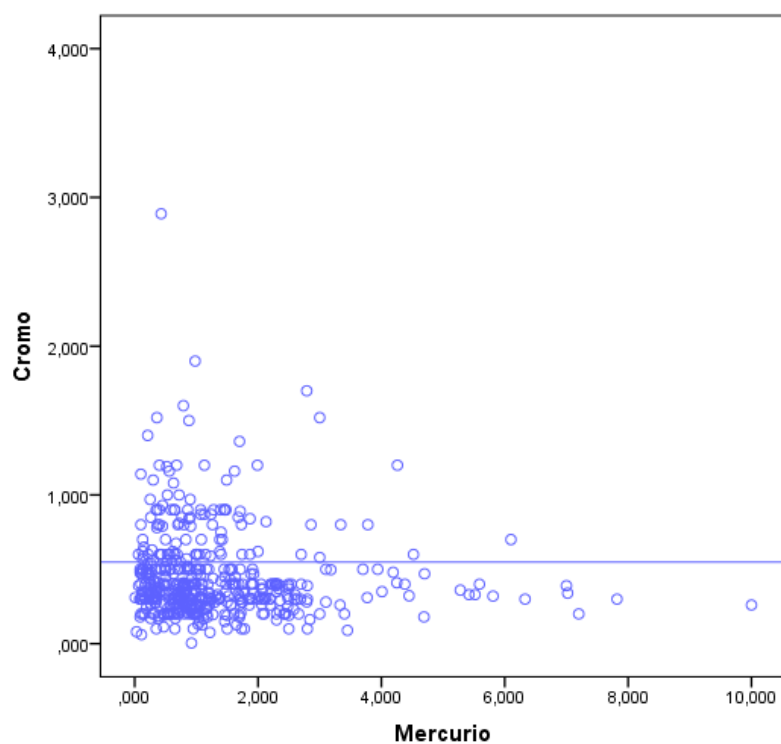


Figura 41 Correlación entre las variables Mercurio y Cromo



4.9.4 Variaciones del Hg en función de la edad y el consumo de pescado

El número de muestras válidas en las que se determinó Hg junto con la variable frecuencia de consumo de pescado fue de n: 504

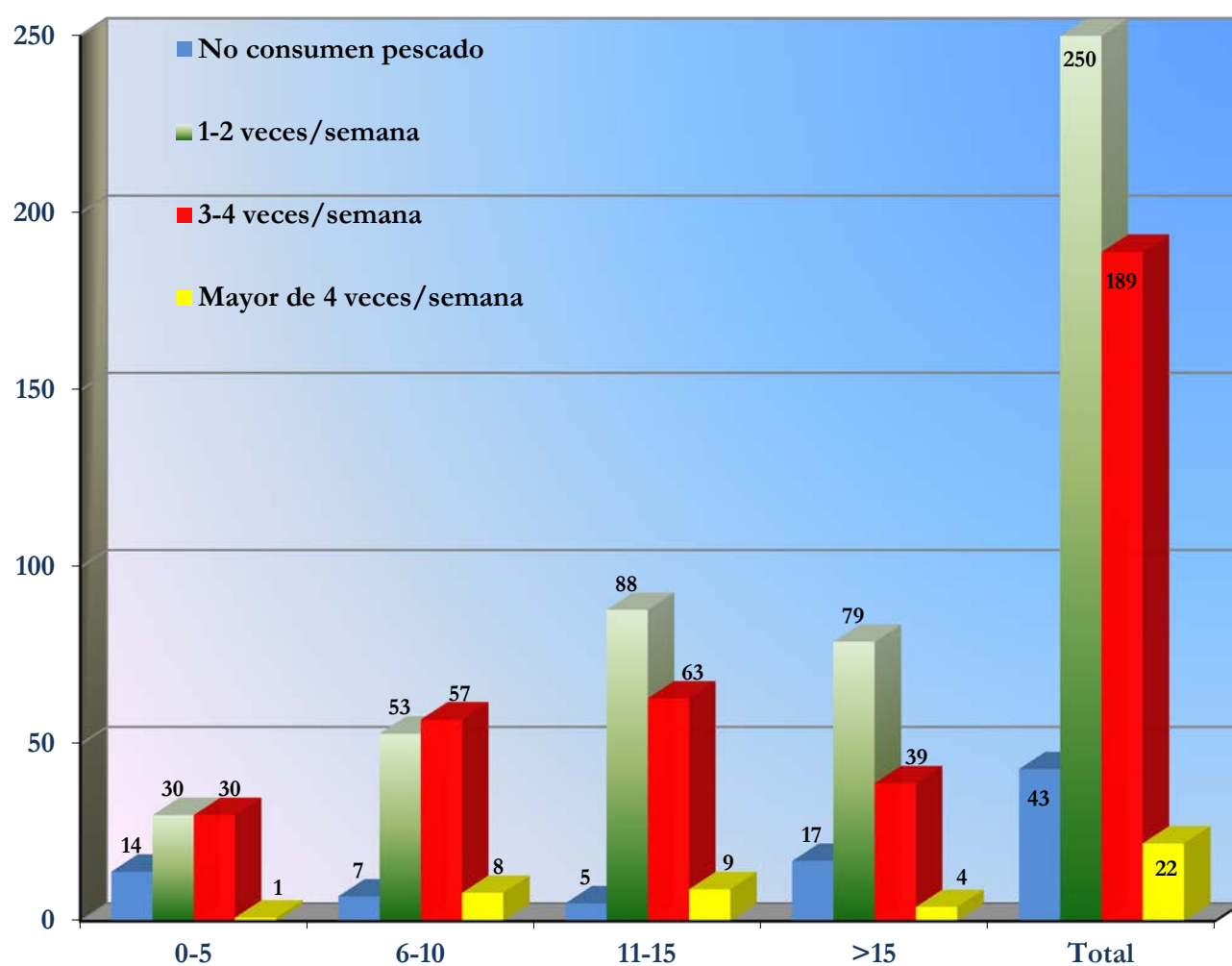
La distribución del consumo de pescado en función de la edad se representa en la siguiente tabla

Tabla 43 Distribución del consumo de pescado en función de la edad

Frecuencias (n)	0-5	6-10	11-15	>15	Total
No consumen pescado	14	7	5	17	43
1-2 veces/semana	30	53	88	79	250
3-4 veces/semana	30	57	63	39	189
Mayor de 4 veces/semana	1	8	9	4	22
TOTAL	75	125	165	139	504

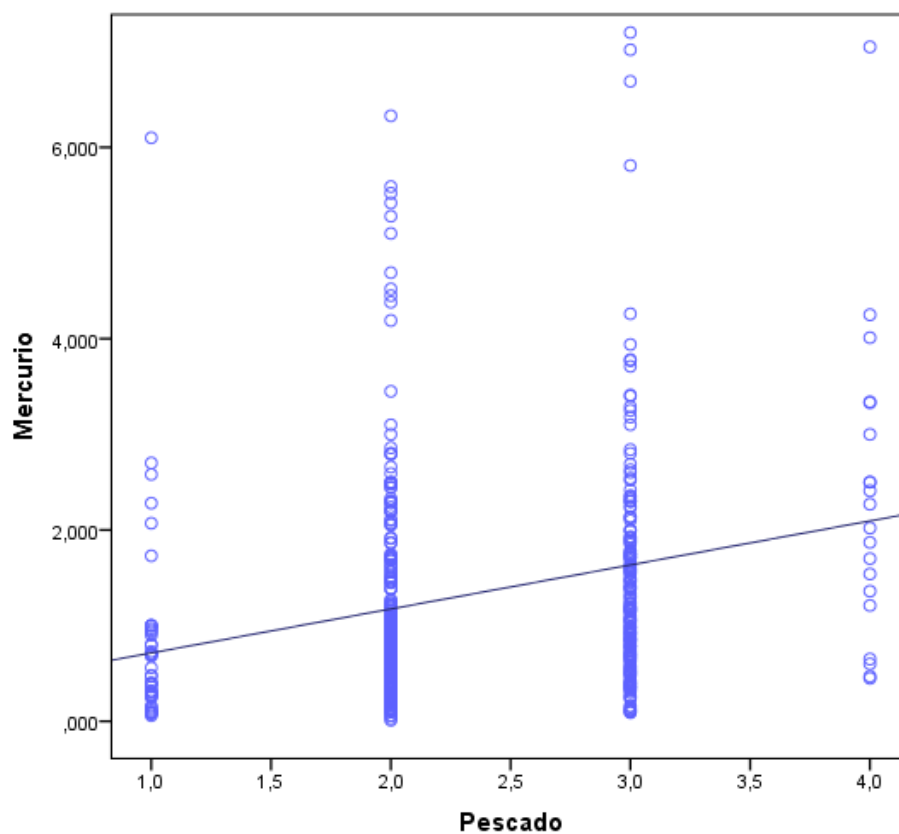
Igualmente, se puede visualizar en la siguiente gráfica de frecuencia de consumo de pescado.

Figura 42 Frecuencia de distribución del consumo de pescado en función de la edad



Por otro lado, se puede apreciar una débil pero significativa correlación positiva entre el consumo de pescado y la concentración de Hg en pelo p: <0.001 R²: 0.267

Figura 43 Correlación entre las variables Mercurio y consumo de pescado



En la tabla siguiente, se muestran los percentiles 25, 50 y 75, así como las medias aritméticas que fueron incluidas para poder establecer comparaciones con otros resultados de la bibliografía consultada.^{4,21}

Tabla 44 Mercurio total en pelo ($\mu\text{g/g}$) en población infantil en función consumo pescado

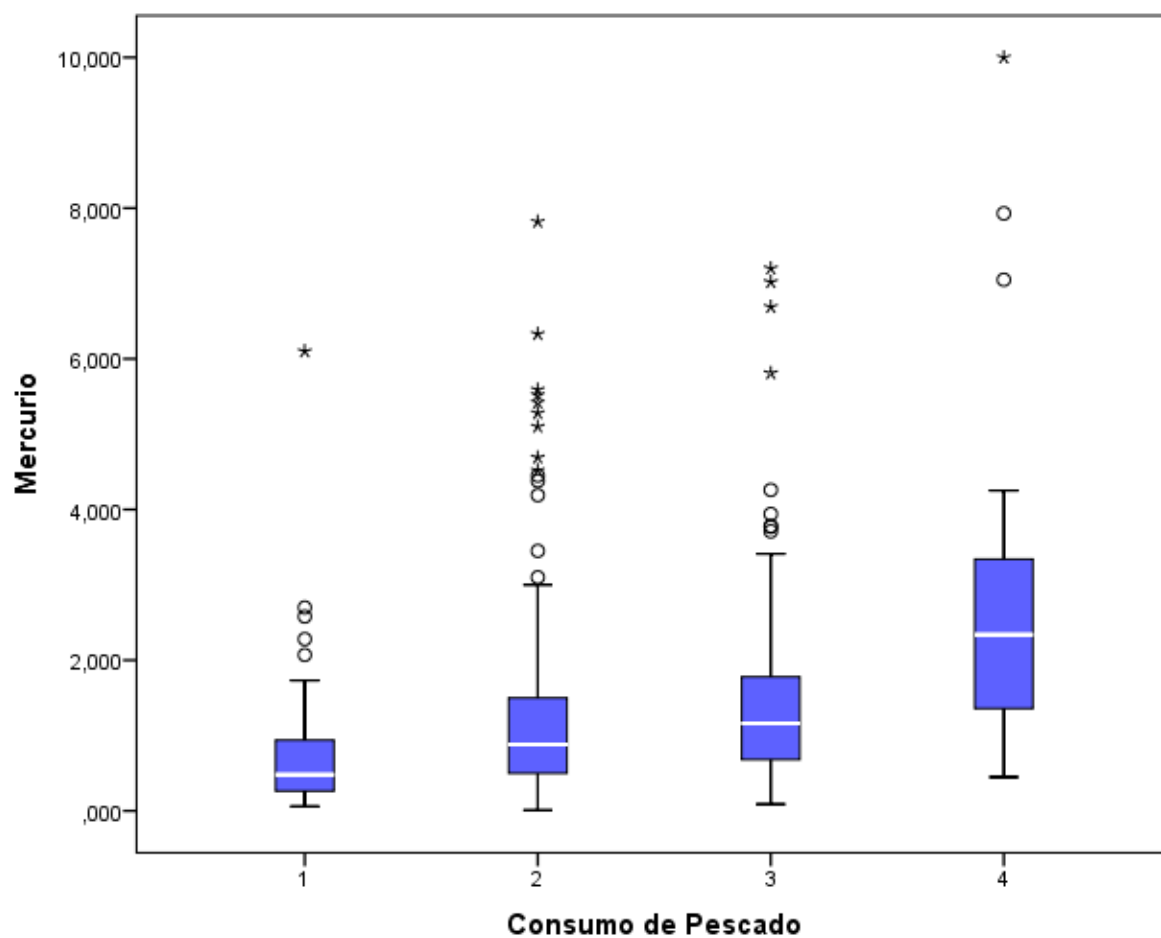
	Núm. casos	Media	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75	Percentil 95
No consumen pescado	43	0.82	0.26	0.48	0.95	2.68
1-2 veces/semana	250	1.21	0.49	0.88	1.51	3.78
3-4 veces/semana	189	1.46	0.67	1.16	1.78	3.74
Mayor de 4 veces/semana	22	2.93	1.32	2.34	3.51	9.69

Mediante la realización del test de Kruskal Wallis se confirma la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las 4 categorías de consumidores de pescado.

En ese mismo sentido se ha empleado el Test de Mann-Whitney para poner de manifiesto las diferencias entre los distintos grupos de frecuencia de consumo de pescado. Para ello se van comparando los grupos por parejas, finalizando cuando se han enfrentado todos con todos. Dado que en este caso se realizan 6 comparaciones la significación estadística aparecerá cuando sea el valor $p < 0.01$ (p debe ser $<$ del resultado obtenido al dividir $0.05 / 6$ diferencias $= 0.008$)

Las diferencias entre los grupos se reflejan visualmente en el diagrama de cajas siguiente

Figura 44 Diagrama de cajas que representa la diferencia de concentración de Hg en pelo en función del consumo de pescado



Asimismo, en las tablas que se representan a continuación, donde se han incluido las medianas de cada grupo y el RIC (rango intercuartílico), se aprecian la diferencias significativas que aparece entre todos las categorías de consumo de pescado

Tabla 45 Diferencias en concentración de Hg entre los grupos de consumo de pescado (no consumidores y consumo de 1-2 veces/semana) y los grupos (no consumidores y consumo de 3-4 veces/semana)

	No consumen	1-2 veces/semana	P	No consumen	3-4 veces/semana	P
Hg (µg/g)	0.48 (0.26-0.95)	0.88(0.49-1.51)	0.001	0.48 (0.26-0.95)	1.16 (0.67-1.78)	<0.001

Mediana y RIC: Rango intercuartílico

Tabla 46 Diferencias en concentración de Hg entre los grupos de consumo de pescado (no consumidores y consumo mayor de 4 veces/semana) y los grupos (consumo de 1-2 veces/semana y consumo de 3-4 veces/semana)

	No consumen	Mayor de 4 veces/semana	P	1-2 veces/semana	3-4 veces/semana	P
Hg (µg/g)	0.48 (0.26-0.95)	2.34(1.32-3.51)	<0.001	0.88(0.49-1.51)	1.16 (0.67-1.78)	0.002

Mediana y RIC: Rango intercuartílico

Tabla 47 Diferencias en concentración de Hg entre los grupos de consumo de pescado (consumo de 1-2 veces/semana y consumo mayor de 4 veces/semana) y los grupos (consumo de 3-4 veces/semana y consumo mayor de 4 veces/semana)

	1-2 veces/semana	Mayor de 4 veces/semana	P	3-4 veces/semana	Mayor de 4 veces/semana	P
Hg (µg/g)	0.88(0.49-1.51)	2.34(1.32-3.51)	<0.001	1.16 (0.67-1.78)	2.34(1.32-3.51)	0.001

Mediana y RIC: Rango intercuartílico

Por último, se representan por grupos etarios las medianas de cada grupo y el RIC (rango intercuartílico)

Tabla 48 Representación de la concentración de Hg en función del consumo de pescado y el grupo de edad

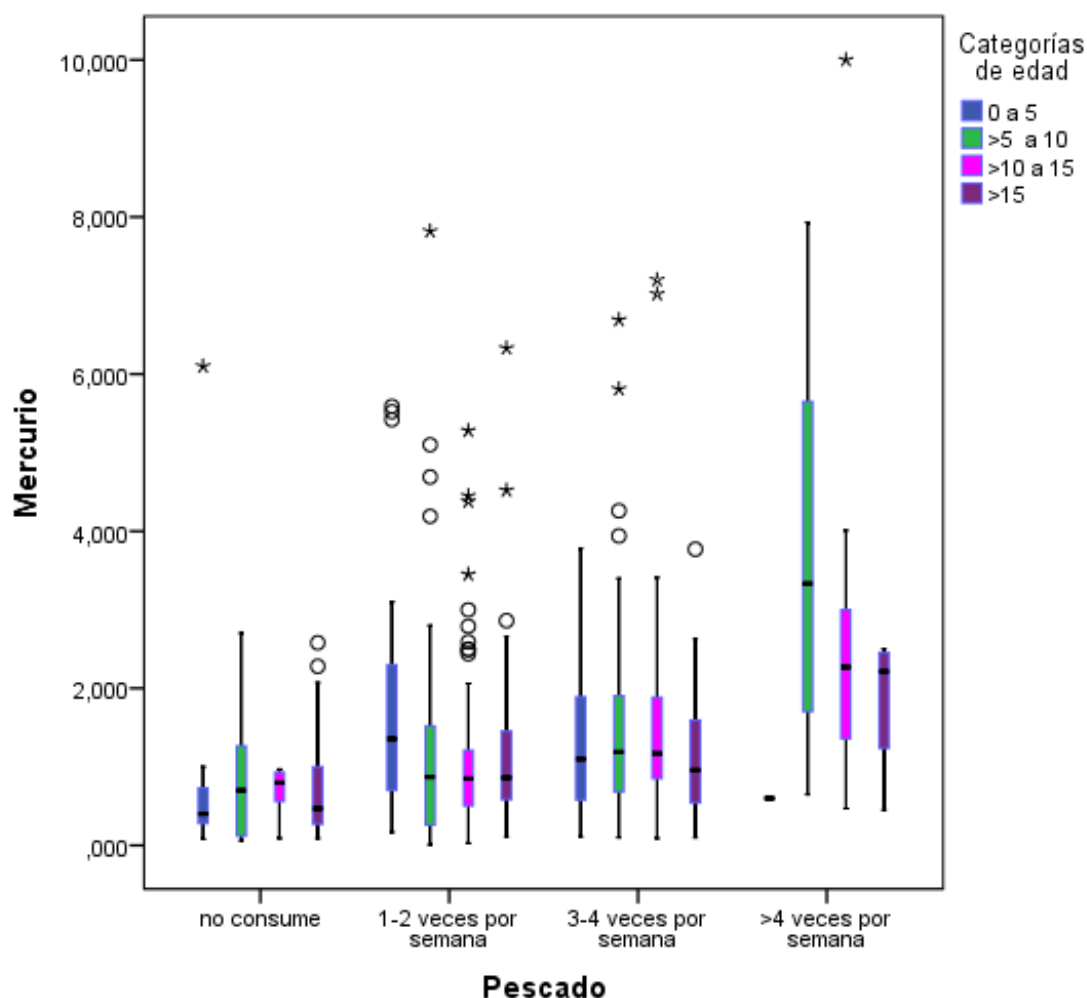
Hg($\mu\text{g/g}$)	0-5 años	6-10 años	11-15 años	>15 años
No consumen pescado	0.4 (0.24-0.77)	0.7(0.1-1.73))	0.8(0.33-0.95)	0.47(0.27-1.0)
1-2 veces/semana	1.35(0.63-2.31)	0.87(0.26-1.61)	0.85(0.50-1.21)	0.86(0.58-1.46)
3-4 veces/semana	1.1(0.57-1.89)	1.19(0.68-1.92)	1.17(0.84-1.92)	0.96(0.52-1.61)
Mayor de 4 veces/semana	-	3.34(1.62-6.35)	2.27(1.28-3.5)	2.22(0.84-2.48)

Mediana y RIC: Rango intercuartílico

En el grupo etario de 0-5 años y dado que únicamente se ha encontrado un caso de consumidor de más de 4 veces a la semana, no queda reflejado en la tabla anteriormente expuesta el valor de la mediana y RIC.

El evaluar las diferencias en los distintos grupos de edad, en función del consumo de pescado, se facilita con el diagrama de cajas que se muestra a continuación

Figura 45 Diagrama de cajas que muestra las diferencias en los distintos grupos de edad en función del consumo de pescado



En la tabla que se muestra seguidamente aparece una clara diferencia entre los que no consumen pescado y aquellos que lo consumen más de 4 veces por semana.

En esta misma tabla, se ha diferenciado el THg (Mercurio total) y MeHg (Metil mercurio). Se ha considerado que el MeHg supone aproximadamente un 80% del THg (Cernichiari et al 1995, Dolbec et al 2001)^{43,44,67}

Tabla 49 Diferencia de Hg ($\mu\text{g/g}$) en pelo en distintos grupos de edad en relación al consumo de pescado

Mediana Hg ($\mu\text{g/g}$)		1 a 5 años		6 a 10 años		11 a 15 años		Mayores de 15	
		Hg	MeHg	Hg	MeHg	Hg	MeHg	Hg	MeHg
Consumen									
más de 4 veces		1,87	1,49	3,34	2,67	2,27	1,82	2,22	1,77
por semana									
No		0,4	0,32	0,7	0,56	0,8	0,64	0,47	0,37
Consumen									

* El MeHg es estimado como el 80% del Hg

4.9.5 Estudio de los niveles de Hg en relación con los establecidos por diferentes Comités internacionales

Basándose en los informes preliminares de los estudios epidemiológicos, llevados a cabo en las islas Feroe, la organización FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) conjuntamente en el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) redujeron el valor del PTWI (Ingesta Tolerable Semanal Provisional) de MeHg, de $3,3 \mu\text{g/kg}$ peso/semana (JECFA 1978) a $1,6 \mu\text{g/kg}$ peso/semana (JECFA 2003). Estos valores se corresponden con unos niveles de mercurio en pelo de $2,2 \mu\text{g/g}$ ^{17,33,38}.

Así mismo, la EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente de los EEUU), estableció la Dosis de Referencia de Ingestión de MeHg (RfD) en 0,1 $\mu\text{g/kg}$ peso/día (EPA 1997). Estos valores se corresponden con unos niveles de mercurio en pelo de 1 $\mu\text{g/g}$ ^{37,39,40}.

Considerando estos diferentes límites de seguridad recomendados tanto por la JECFA como por la EPA y tratándose éste, de un estudio descriptivo trasversal, se han descrito las Razones de Prevalencia “RP” y los Factores de Protección “FP” empleando como niveles de corte los límites citados anteriormente.

Antes de iniciar el estudio estadístico inferencial se procedió a establecer 2 categorías de frecuencia de consumo de pescado. De esta forma, se crearon los consumidores de más de 3 veces por semana y los que consumían menos de 3 veces por semana.

Tabla 50 Representación de la diferencia entre consumidores de más de 3 veces por semana y los que consumían menos de 3 veces por semana.

	Número	Porcentaje	p
Consumo menor de 3 veces/semana	293	58.2%	<0.001
Consumo mayor de 3 veces/semana	211	41.8%	<0.001

A partir de este momento se realizó un test de Mann-Whitney para confirmar que aparecía diferencia significativa entre ambos grupos en relación al Hg

Se han empleado tablas de contingencia y se han establecido dos nuevas categorías de consumo de pescado. Estas categorías representan a aquellos individuos que consumen

pescado más de 3 veces semana y aquellos que consumen un valor menor de 3 veces por semana.

En este sentido y siguiendo las directrices de la EPA se obtienen los siguientes resultados

Tabla 51 Análisis univariado para los grupos de consumo de pescado (menor de 3 veces/semana y mayor 3 veces/semana) asociados a concentraciones de Hg en cabello $\geq 1 \mu\text{g/g}$

	N	%Hg $\geq 1 \mu\text{g/g}$	RP	95%	IC
Consumo menor de 3 veces/semana	293	37,2%	1		
Consumo mayor de 3 veces/semana	211	59,2%	1,592	(1.322-1.918)	<0.001
Total	504				

A partir de los resultados mostrados en la tabla anterior se puede deducir que los niños/ adolescentes que consumen más de 3 veces pescado a la semana tienen entre 1.32 y 1.92 veces más Hg que los que consumen menos de 3 veces.

Al mismo tiempo, se puede establecer que aquellos que consumen pescado menos de 3 veces a la semana tienen aproximadamente un 35% menos riesgo de tener el Hg $> 1 \mu\text{g/g}$ que los consumen pescado más de 3 veces a la semana.

Factor de Protección:

FP: 1- RP: 1-0.649: 0.351

FP: 35% IC 95% (1-0.539 a 1-0.781): (0.461 – 0.219)

Por otro lado, siguiendo las directrices de la JECFA se obtienen los siguientes resultados

Tabla 52 Análisis univariado para los grupos de consumo de pescado (menor de 3 veces/semana y mayor 3 veces/semana) asociados a concentraciones de Hg en cabello $\geq 2,2 \mu\text{g/g}$

	N	%Hg $\geq 2.2 \mu\text{g/g}$	RP	95%	IC
Consumo menor de 3 veces/semana	293	16,7%	1		
Consumo mayor de 3 veces/semana	211	24,2%	1,445	(1,019-2,051)	0,04
Total	504				

Asimismo, considerando los resultados mostrados en la tabla anterior se puede deducir que los niños/adolescentes que consumen más de 3 veces pescado a la semana tienen entre 1.02 y 2.05 veces más Hg que los que consumen menos de 3 veces.

De igual modo que en el caso anterior, se estima que aquellos que consumen pescado menos de 3 veces a la semana tienen aproximadamente un 8,9% menos riesgo de tener el Hg $> 2.2 \mu\text{g/g}$ que los consumen pescado más de 3 veces a la semana.

Factor de Protección:

FP: 1- RP: 1-0.911: 0.089

FP: 8.9% IC 95% (1-0.831 a 1-0.998): (0.169 – 0.002)

Este mismo estudio se llevo a cabo diferenciando la variable sexo en las categorías femenino y masculino, utilizando los mismos niveles de corte empleados anteriormente

Tabla 53 Análisis univariado para los grupos varón y hembra asociados a concentraciones de Hg en cabello $\geq 1 \mu\text{g/g}$

	N	%Hg $\geq 1 \mu\text{g/g}$	RP	95%	IC
Varón	234	48.3%	1		
Hembra	301	46.8%	1.031	(0.862-1.233)	0.704
Total	535				

Por ello, se puede objetivar que en función del sexo (p : 0.704) y los límites de seguridad recomendados por EPA y JECFA no se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

A continuación, merece la pena destacar el porcentaje de niños/adolescentes que excede el límite de seguridad establecido por la EPA que equivale a prácticamente el 50% de la población y por otro lado, el porcentaje de niños/adolescentes que excede el límite de seguridad establecido por la JECFA que en este caso representa un 17% de la población

Tabla 54 Porcentaje de niños/adolescentes de nuestra población que exceden los límite de seguridad establecidos por la EPA y por la JECFA

	Número	Porcentaje
EPA $\geq 1 \mu\text{g/g Hg}$	239	48%
JECFA $\geq 2.2 \mu\text{g/g Hg}$	84	17%

Finalmente, es importante significar que entre las adolescentes mayores de 15 años, en edad fértil, con una mediana de $0.83 \mu\text{g/g}$ y RIC ($0.48\text{-}1.43$) $\mu\text{g/g}$. Un 40.8% de las mismas presenta un valor superior al establecido por la EPA para el Hg en $1 \mu\text{g/g}$ y un 12.2 % un valor superior al establecido por la JECFA para el Hg en $2.2 \mu\text{g/g}$. Siendo, asimismo, en este grupo de edad el valor máximo de Hg encontrado de $4.52 \mu\text{g/g}$.

Discusión

5. Discusión

Determinar el nivel de concentración de elementos esenciales y tóxicos durante el período de crecimiento puede llegar a ser complicado por los cambios tan dinámicos que se producen en la infancia ⁷². En ningún otro período de la vida humana ocurren tal cantidad de cambios bioquímicos como en el período de desarrollo postnatal, donde los procesos anabólicos superan a los catabólicos.

Entre los factores exógenos que pueden influir durante el desarrollo se pueden distinguir los siguientes modificadores:

- Influencias biogeográficas que actúan como modificadores naturales: cambios climáticos, fuentes de agua mineral, composición del aire, fauna y flora...
- Socioeconómicos que actúan como modificadores culturales: nivel de educación de los padres, condiciones materiales, nutrición durante el embarazo y en los recién nacidos, hábitos tabáquicos de los padres, nivel de industrialización en el medio ambiente de los padres, acceso a los servicios sanitarios...

Entre los factores endógenos, los genéticos juegan un papel determinante. Por ejemplo, los niños se adaptan más fácilmente a las consecuencias de la malnutrición y su crecimiento en ese período se enlentece. Si las causas de malnutrición son eliminadas, los niños regresan más rápidamente que las niñas a su ritmo previo de crecimiento.

Desde el segundo año de vida en adelante, se observa una ralentización general en el crecimiento que va de 12 cm en el segundo año a 8 cm en el tercero. En este período las niñas adquieren una mayor coordinación motora y desarrollo del lenguaje.

El menor crecimiento en altura y peso se produce en el período que va desde los 6 a los 7 años. En el período que abarca de los 4 - 6 años tiene lugar la mineralización de los huesos. A partir de los 6 los dientes de leche se remplazan.

Durante todo este período cualquier desviación asociada con el desarrollo individual de los niños tiene consecuencias negativas que se ponen de manifiesto de muy diversas formas. Por este motivo, resulta de vital importancia, establecer unos valores de referencia de elementos traza tanto a nivel infantil como juvenil a fin de evidenciar cualquier pequeña alteración en el desarrollo.

Consideraciones sobre variables

En referencia a la variable edad:

Algunas variables han sido modificadas en el transcurso de la investigación, entre ellas la variable edad, en aras a obtener una mayor información de los datos del estudio.

Mención especial merece la elección del límite de edad en esta investigación en los 18 años. Dado que si bien es rigurosamente cierto que durante la adolescencia se es menos sensible que durante el período fetal o infantil, no es menos cierto que dichos adolescentes son más sensibles que los adultos. A este respecto, el programa de Naciones Unidas para contaminantes químicos y medio ambiente “UNEP”³⁰⁷ incorpora en sus grupos de estudio adolescentes hasta los 17 años.

En este sentido, dos de los grandes estudios de biomonitorización humana a nivel mundial, el desarrollado en los Estados Unidos NHANES²⁰⁵ y el que se realiza en Canadá³³⁴ incorporan adolescentes hasta la edad de 19 años. De hecho, en el NHANES las categorías empleadas en la población infanto – juvenil son las siguientes: Niños de 1 a 5 años; niños de 6 a 11 años y adolescentes de 12 a 19 años. Sin embargo, la encuesta de salud canadiense emplea el grupo de edad de 6 a 19 años en su totalidad³³⁴.

5.1 Consideraciones sobre Valores de Referencia

El establecimiento de unos valores de referencia guía de los diferentes parámetros en muestras de cabello se ha realizado, con ligeras modificaciones, siguiendo las directrices de la IFCC que hizo suyas la IUPAC^{142,263} en 1997, dado que, al mismo tiempo, estas directrices han sido asumidas, en los grandes estudios de biomonitorización humana que se llevan a cabo periódicamente tanto en Europa (Alemania y República Checa)^{27,28,126,262} como en América del norte (EEUU y Canadá). Así, con la finalidad de poder comparar nuestros valores guía con los establecidos en los diferentes estudios de biomonitorización internacionalmente reconocidos (GERES, NHANES, CHMS...)²⁰⁵ se han seleccionado los percentiles 5 y 95 de nuestra población a fin de obtener dichos intervalos de referencia.

La elección de un límite inferior, percentil 5, aun no siendo adecuada para elementos tóxicos (Pb, Cd, Hg, As, Mn, Bi, Tl...), que sería deseable que no aparecieran en el ser humano, proporciona una información muy apropiada para contrastar con otros estudios. Razón ésta, que ha motivado la inclusión de este límite en elementos tóxicos. Asimismo, la introducción de dicho percentil 5, en lugar del percentil 2,5, podría deberse a que algunos elementos traza presentan un LD, por encima del percentil 2,5.

Por lo tanto, no han sido seleccionados los percentiles 2,5 y 97,5, a fin de armonizar los resultados obtenidos, a los reflejados en los grandes estudios de biomonitorización humana, dado que, unos valores de referencia guía, adecuadamente establecidos, serán necesarios para la interpretación de posteriores estudios que se puedan realizar¹⁸⁰.

Por otro lado, para dar validez a los valores de referencia que representan a una población, éstos deben derivar del estudio de una muestra representativa suficientemente grande. En esta misma línea, es de vital importancia, seleccionar un tamaño muestral que sea considerado representativo de la población general.

Así, en Alemania los valores de referencia de la población son establecidos por la HBC *Human Biomonitoring Commission* de la Agencia Federal Medioambiental a partir de los resultados de la muestra poblacional analizada en el *German National Health Survey*,

GerES^{27,126,262}. En este sentido, para el establecimiento de los valores de referencia en pelo de población infante - juvenil se utilizó una muestra de 736 niños de edades comprendidas entre 6 y 14 años. Sin embargo, el número final de muestras válidas empleadas osciló dependiendo del elemento entre los n: 638 a los n: 711

Merece la pena destacar que en nuestro estudio han participado 648 niños, siendo este dato muy superior al tamaño muestral necesario para hacer representativa nuestra muestra de la población general, lo que le otorga unas más que suficientes condiciones de fiabilidad

Seguidamente, continuaremos con la discusión contrastando con otros estudios realizados en España para posteriormente comentar diferentes estudios a nivel internacional.

Estudios realizados en España

La búsqueda en la literatura científica de estudios del mismo tipo realizados en España fue inicialmente bastante infructuosa dado que no se encontraban trabajos de investigación que determinaran un número adecuado de elementos traza en cabello de población infantil. Finalmente, en la Universidad Rovira i Virgili, en Tarragona, en las últimas décadas han germinado un número no despreciable de investigaciones. Obviamente, el que pertenezcan todos los estudios encontrados en España a una misma área geográfica confiere a la discusión ciertas limitaciones. Además, no se ha encontrado ninguna investigación que abarque un espectro de edades tan amplio como el nuestro.

No obstante, más adelante incluiremos otros estudios, desarrollados en diferentes áreas de nuestra geografía que, aun siendo limitados en los parámetros a determinar pueden aportar cierta información valiosa en este contexto.

El primer estudio a mencionar fue el dirigido por Granero S. et al en 1998¹²⁰. Desarrollado en 3 áreas residenciales vecinas a una central incineradora en la provincia de Tarragona. Se tomaron muestras de cabello de 124 alumnos (69 niñas y 55 chicos) de 11 a 13 años, determinándose en ellas: As, Be, Cd, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn, Tl, V. Se utilizó un ICP-MS. En éste, las concentraciones de Be, Tl y V se encontraban por debajo del límite de detección (LD: 0.04 µg/g) hecho similar a lo que ocurrió en nuestro estudio en el caso de Be,

no así para el Tl. Además, no aparecen diferencias significativas en función del sexo. Curiosamente, en nuestro estudio, en algunos elementos sí aparecen diferencias en función del sexo. Por otro lado, se evidencian diferencias en función de la zona o lugar de residencia (centro de ciudad, cerca de una empresa petroquímica y en las proximidades de una planta incineradora). La menor concentración en pelo se muestra en el As y la mayor en el Pb. Dado que el nivel de Pb en la gasolina fue reducido de 0.4 a 0.15 g/L en 1991, se ha evidenciado una disminución en su nivel medioambiental y por ende, en el pelo. Así, Schuhmacher et al²⁶⁰ en 1991, encontraban en este mismo área geográfica, una media geométrica de Pb en pelo de 11.9 µg/g versus 4.6 µg/g en 1998 en el estudio de Granero et al.

El siguiente estudio realizado por Martí N et al en 2004^{201,202}, fue llevado a cabo, de igual forma que el citado anteriormente, en 3 áreas residenciales vecinas a una central incineradora en la provincia de Tarragona. En este caso, se tomaron muestras de cabello de 134 alumnos (81 chicas y 53 chicos) de edades comprendidas entre 12 y 14 años, determinándose mediante ICP-MS los siguientes elementos: As, Be, Cd, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn, Tl, V. En éste, las concentraciones de As, Be, Tl y V se encontraban por debajo del límite de detección (As y Be con LD: 0.13 µg/g y Tl con LD: 0.03 µg/g y V con LD: 0.3 µg/g), hecho similar a lo que ocurrió en nuestro estudio en el caso de Be, no así para el Tl ni para el As. Asimismo, no se encuentra correlación significativa entre el sexo y el nivel de metales en pelo. Curiosamente, en nuestro estudio en algunos elementos sí aparecen diferencias en función del sexo lo que podría obedecer al diferente tamaño muestral y al período de edad tan limitado al que hace referencia este estudio. Por otro lado, se evidencian diferencias en función de la zona o lugar de residencia (centro de ciudad, cerca de una empresa petroquímica y en las proximidades de una planta incineradora). La menor concentración en pelo se muestra en el As y la mayor en el Pb. Dado que el nivel de Pb en la gasolina fue reducido de 0.4 a 0.15 g/L en 1991, posteriormente en 1998 disminuyó a 0.005 g/L, para finalmente prohibirse en 2001, se continúa evidenciado una disminución en su nivel medioambiental y por ende, en el pelo. En este sentido, Schuhmacher et al en 1991 encontraban una media geométrica de Pb en pelo de 11.9 µg/g, posteriormente en un estudio piloto inicial a éste en 1998 la media aritmética era de 4.6 µg/g y, finalmente en éste, se ha encontrado una media aritmética de 0.86 µg/g y mediana de 0.31 µg/g.

El último estudio de la serie citada hasta el momento fue dirigido por Ferré- Huguet N. et al en 2008⁹⁶. Los resultados obtenidos fueron comparados con los previamente citados. Se

realizaron, de nuevo, en 3 áreas residenciales vecinas a una central incineradora en la provincia de Tarragona. Entre abril y junio de 2007 se recolectaron muestras de pelo de 96 estudiantes (48 chicos y 48 chicas), de edades comprendidas entre 12 y 14 años, determinándose en ellas mediante ICP-MS los siguientes elementos: As, Be, Cd, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn, Tl, V. En éste, las concentraciones de As, Be y Tl se encontraban por debajo del límite de detección (Be con LD: 0.13 µg/g y As y Tl con LD: 0.03 µg/g), hecho similar a lo que ocurrió en nuestro estudio en el caso de Be, no así para el Tl ni para el As. En general, se ha observado una disminución de la concentración de dichos elementos con el paso de los años, a excepción del Cr cuyo nivel ha aumentado situándose su media aritmética en 1.31 µg/g (DE: 1.14) valor que continúa siendo mayor que en 1998. Si se hace una comparación con nuestro estudio, se observa que el Mn, Pb, Hg y Ni y As en menor medida, son elementos que presentan concentraciones superiores en el nuestro. Probablemente, en el caso del Hg, esto obedece al mayor consumo de pescado en la comunidad de Madrid respecto a la comunidad Catalana.

Mención especial merece otro estudio, el realizado por Torrente M et al en 2004 ²⁹⁸ puesto que en él se evaluaba la relación entre los niveles de diferentes metales en pelo y las posibles alteraciones en la función cognitiva en los niños y adolescentes. Fueron seleccionados para esta investigación 39 niños y 61 niñas de 12 a 14 años de edad, procedentes de varios colegios en la provincia de Tarragona. Las concentraciones de Cd, Cr, Hg, Pb, Mn, Ni y Sn se determinaron en un ICP-MS. En los adolescentes fue evaluada la atención, la capacidad visuoespacial y el razonamiento abstracto como indicadores del posible daño cognitivo. Se establecieron 3 categorías en función de la atención: baja, media y alta. Referente a los resultados, no se encontró correlación alguna entre Cr, Mn, Ni y Sn y la función cognitiva. Respecto al Cd, la mayoría de sus resultados se situaban por debajo del límite de detección. Hecho éste, totalmente diferente a lo acaecido en nuestro estudio. Por otro lado, se objetivó una débil pero significativa correlación negativa entre los niveles de Pb en pelo y la atención. Finalmente, y pese a que el Pb, en las diferentes matrices sangre y pelo, no correlaciona adecuadamente y dada la asociación encontrada entre el Pb y la atención, se estimó que el pelo podría ser una muy útil herramienta para la biomonitorización de grupos de población expuestos a Pb.

Por otro lado, considerando el claro descenso de los niveles de Plomo en pelo en los diferentes estudios mencionados, merece la pena resaltar que aunque la toxicidad del plomo

es conocida desde la antigüedad, sin embargo no es hasta los años 70, cuando en Europa el Consejo de las Comunidades Europeas adopta el 29 de marzo de 1977, la Directiva 77/312/CEE del Consejo, sobre la vigilancia biológica de la población frente al peligro del saturnismo. De este modo, se insta a que los estados miembros a que tomen las medidas oportunas para aplicar un procedimiento común de vigilancia biológica con el objetivo de evaluar la exposición de la población al peligro de la intoxicación por plomo. A raíz de esta directiva, muchos países en Europa inician programas de biomonitorización de la población general²⁷.

Asimismo, es sobradamente conocido que el plomo no se degrada, por lo que los millones de toneladas de plomo lanzadas al aire por el uso de la gasolina con plomo han contaminado los suelos, especialmente en las áreas urbanas y permanecen en la atmósfera a concentraciones muy bajas. Esto se hace visible en grandes ciudades como Madrid y Barcelona donde la concentración de plomo en la atmósfera, a pesar de haber disminuido enormemente en los últimos años continúa, desde el año 2002, manteniendo los niveles de Pb en unas cifras de aproximadamente 0,02- 0,01 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.^{148,260}

En este mismo sentido, en España en 1989 se introduce la gasolina sin plomo, definida como aquella con una concentración de plomo inferior a 0,013 g/L. A partir del 1 de Junio, el contenido máximo de las gasolinas sin plomo se rebaja a 0,005 g/L y el de la gasolina con plomo a 0,15 g/L hasta su prohibición en agosto de 2001 (RD 1728/2001). Al igual que en otros muchos países, en España, la reducción de la concentración de plomo en sangre fue paralela a la desaparición gradual del plomo en la gasolina junto con la disminución de la concentración de plomo ambiental y por ende, como se ha puesto de manifiesto en los estudios previamente citados la disminución de los niveles de Pb en pelo ^{260,331}

La eliminación de esta gran fuente de exposición aceleró el progreso en la identificación de efectos adversos del plomo con concentraciones que se consideraban seguras hasta entonces. Consecuentemente con esto, en los últimos años, el CDC ha ido reduciendo progresivamente el umbral de plomo en sangre a partir del cual se describen efectos nocivos para la salud, no existiendo evidencia científica de que exista algún umbral seguro ^{157,301}.

Tabla 55 Concentración de elementos traza en pelo en diferentes estudios nacionales e internacionales

	Edad / n	As	Cd	Cr	Hg	Mn	Ni	Pb	Cu	Zn
Presente Estudio	0-18 n:645	0,07**	0,018**	0,36**	0,97**	0,33**	0,50**	0,7**	25,7**	121**
Tarragona (1998) Granero ¹²⁰	11-13 n:125	0,03*	0,18*	0,36*	0,67*	0,26*	0,65*	5,81*		
Tarragona (2002) Nadal ²⁰²	12-14 n:134	<0,10*	<0,03*	0,37*	0,70*	0,16*	0,27*	0,86*		
Tarragona (2008) Ferré ⁹⁶	10-15 n:96	0,02*	0,02*	1,31*	0,56*	0,21*	0,48*	0,58*		
Repúbli.Checa (2003) Benes ²⁸	8-11 n:3556		0,14**	0,22**	0,19**			1,6**	12**	124**
GerES IIb. (1991/1992) Seifer (Alemania) ²⁶²	6-14 n: 736		0,05*	0,09*				1,0*	12**	160**
Italia (1999) Senofonte ²⁶³	3-15 n:412	0,06**	0,14**	0,42**		0,25**	0,50**	5,60**	10,1**	149**
Italia (2011) Dongarra ^{69,70}	11-13 n:137	0,00**	0,03**	0,07**		0,27**	0,42**	0,78**	19,95**	179**
Japón (2000) Takashi ²⁵¹	6-20 n:418					2,3			13,7*	111*
Korea (2006) Park ²¹⁴	3-6 n:655		0,07**	0,38**	0,43**	0,25**		1,43**	11,8**	66,23**
Pakistán (2010) Shah ²⁶⁴	1-10 n:132		0,27***	0,38***			0,69***	7,2***	13,4***	225***
Bolivia(2010) Barbieri ²³	7-12 n:242	0,62*	0,08*	0,10*	0,23*	0,98*	0,32*	5,69*	8,45*	102*

* Media Geométrica; ** Mediana; ***Media Aritmética

Estudios realizados a nivel internacional

En Europa, el plomo añadido a la gasolina (en concentraciones de 0,6 g/L) también supuso la principal fuente de contaminación ambiental por plomo. Alemania fue por delante de las restricciones de la Unión Europea ³³¹ lo que se refleja en los resultados de la Encuesta Ambiental Alemana (*German Environmental Survey* - GerES).²⁷

La Encuesta Ambiental Alemana forma parte de un programa de biovigilancia para determinar la exposición de la población general a contaminantes ambientales. La muestra poblacional procede del *German National Health Survey*, siendo representativa de la población alemana. Este estudio se suele realizar a intervalos de aproximadamente 5 a 7 años. El objetivo inicial de estos estudios era el establecimiento de unos Valores de Referencia representativos de su población que permitiesen la posterior interpretación de los resultados de lo estudios de biomonitorización realizados con cierta periodicidad.

En esta misma línea, es necesario significar que el conocimiento de los valores de referencia de elementos traza ha experimentado una gran evolución en las últimas décadas gracias a proyectos como el EURO TERVIHT (*Trace Element Reference Values in human tissues*)^{240,325} cuyo objetivo era el establecimiento y posible comparación de los Valores de Referencia de diferentes países de la Unión Europea y, en otros continentes, paralelamente, estudios como el de Paschal et al, en Estados Unidos, en 1998, comenzaron a mostrar intervalos de referencia para diferentes metales que habían sido analizados en el marco de NHANESIII (*National Health and Nutrition Examination surveys*)²⁰⁵

El primer estudio de biomonitorización ambiental alemán, el GerES I, se llevó a cabo entre 1985 y 1986. Participaron 2700 personas entre 25 y 69 años. En 1990/1991 se realizó el segundo (GerES IIa). La unificación de Alemania, permitió ampliar este estudio a la anterior República Democrática Alemana en 1991/1992 (GerES IIb)^{27,262}. En éste, participaron un total de 4021 individuos, 2524 de Alemania occidental y 1763 de Alemania oriental de edades entre 25 y 69 años y 736 niños de edades comprendidas entre 6 y 14 años. Se recopilaban muestras de sangre, orina y pelo. Asimismo, se administraron cuestionarios que incluían características demográficas y de hábitos de vida en aras de facilitar la interpretación de los resultados

En lo que respecta al método, las muestras de pelo fueron digeridas según el procedimiento de la IAEA³⁴² y analizadas mediante ICP-MS. Se determinaron 11 elementos en pelo, de ellos son únicamente 9 los compartidos en ambos estudios (GerES y presente estudio). Se puede observar que en el GerES el Al, Sr, Cr y Cu presentan una concentración inferior a la de nuestro estudio. Mientras que, ocurre lo contrario con el Zn, Ba, Cd, y Pb. Asimismo, aparecían diferencias en función del sexo, manifestándose una mayor concentración de Sr, Cu y Ba en las hembras y de Al, Pb, Cd y Cr en los varones.

Curiosamente, en nuestro estudio únicamente se encuentra más elevado en el varón el Tl, elemento que no se valora en el GerEs.

Finalmente, la comparación de ambas muestras poblacionales presenta ciertas limitaciones como puede ser el contrastar una población de 6 a 14 años con otra de 0 a 18 años.

Otro país, a nivel europeo, en el que se han desarrollado grandes estudios de Biomonitorización, integrados en el proyecto *Human Biological Monitoring* (HBM),¹²⁶ es la República Checa. En 1994, se iniciaron los dos estudios más importantes llevados a cabo como parte del Proyecto Nacional de Mediambiente y Salud, a fin de determinar la exposición de la población general checa a los contaminantes ambientales. El período de estudio de este proyecto tuvo lugar entre los años 1994 y 2003.

En el estudio de Benes B et al²⁸ (República Checa, 2003), participaron 3556 niños, de ellos 1815 niñas y 1741 niños con una edad media de 9,9 años. Las muestras de pelo se recopilaron en el período de 1994 a 2001, fueron digeridas según el procedimiento de la IAEA y analizadas mediante espectrofotometría de absorción atómica. Se determinaron 7 elementos traza en pelo Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Se y Zn. Comparando con nuestro estudio, los valores de Zn y Cd son ligeramente superiores en éste junto con el Pb que se acredita como muy superior, mientras que los valores de Cr, Cu, Hg y Se son superiores en el nuestro. En el caso de Hg, nuestros niveles se sitúan muy por encima de los niveles checos, dato que obedece probablemente a la gran diferencia de consumo de pescado que existe entre ambos países. Respecto a los niveles elevados de Pb, posiblemente el estudio se llevó a cabo en el periodo en el que el Pb no había sido totalmente eliminado de la gasolina. Asimismo, manifiestan diferencias en función del sexo tres parámetros Cu, Cd y Zn. Respecto a los dos primeros elementos, en nuestro estudio también se encuentran las mismas diferencias. En el caso del Zn, nosotros no encontramos diferencias en función del sexo.

Por último, pueden aparecer ciertas discrepancias al comparar las dos muestras poblacionales dado que se contrastan dos poblaciones una la española, en la que se selecciona los grupos de edad 6-10 y 11-15 y otra la checa de edades comprendidas entre 8 a 11 años.

En Polonia, en el estudio realizado por Duniez – Sokolowska A. et al ^{72,73} en el período 1991-2004, se seleccionó una muestra de aproximadamente 4000 niños de edades comprendidas entre uno y diez años. En el pelo se determinaron Ca, Mg, Zn, Cu, Fe, Pb y Cd. En las investigaciones se observaba que el Zn, en el período de edad comprendido entre los 7 y 10 años, manifestaba diferencias significativas en función del sexo, siendo sus niveles superiores en las niñas, hecho éste que no ocurre en nuestro estudio donde no se manifiestan diferencias para el Zn. Sin embargo, en el caso del Cu ocurre lo opuesto. Nosotros encontramos diferencias por razón de sexo, siendo mayores los valores de Cu en el grupo femenino, sin embargo en el estudio de la población polaca, éstas no se han encontrado. Respecto al Fe se ha objetivado en dicho estudio un aumento de sus niveles entre los 3 y 5 años. En nuestro caso, el Fe se encuentra más elevado en el grupo de edad de 0 a 5 para posteriormente ir disminuyendo, primero de forma muy somera y posteriormente de forma clara. Asimismo, se observa que las concentraciones de Pb y Cd son más elevadas en el grupo de edad de 0 a 5 años, manifestándose a partir de los 6 años un descenso sutil que se convierte en significativo a partir de los 11 años. Además, los niveles de Pb en el grupo de 0 a 5 años son ligeramente más elevados en el niño aunque no de forma significativa. Este hecho aparece de forma opuesta en el caso del Cd. Por otro lado, nuestros valores de Cu tanto en el grupo de 0 a 5 años como en el grupo de 6 a 10 son superiores a los mostrados en los niños polacos, mientras que en caso del Zn ocurre lo opuesto. Nuestros valores para el Zn son inferiores a los informados en este estudio.

En un país mediterráneo, Italia, encontramos dos estudios. El primero el de Senofonte et al²⁶³ en 1999, en diferentes áreas de Roma, donde seleccionó una población de 412 niños de edades comprendidas entre 3 y 15 años, agrupándolos por categorías de edad en 3 grupos. Niños de 3 a 6 años de edad, niños de 7 a 10 años de edad y niños de 11 a 15 años. En las muestras de pelo obtenidas se determinaron 19 elementos mediante el empleo de un ICP-AES. Curiosamente, el parámetro Zn presentaba una distribución normal, no así el resto de los elementos. Los niveles encontrados para la mayoría de los elementos traza son superiores a los observados en nuestro estudio, excepción a este patrón son el Al y Cu que aparecen en mayor concentración en el nuestro y As y Mn que prácticamente no varían. Por otro lado, diferencias en función del sexo únicamente se manifiestan en el Sr, mientras que nosotros las encontrábamos en éste y, además en: Bi, Co, Mn, Ag, Cd, Cu, Ba, y Tl. La presencia de altos

niveles de Pb obedece probablemente a la presencia del Pb en las gasolinas en el momento del estudio

De nuevo en Italia, en Palermo, fue estudiado un grupo de 137 niños de edades comprendidas entre 11 y 13 años^{69,70}. Las muestras de pelo se recopilaron y fueron digeridas según el procedimiento de la IAEA³⁴². Asimismo, fueron determinadas en ellas 19 elementos mediante un ICP-MS. Los elementos mayoritarios Zn y Cu eran seguidos en proporción por Al > Sr > Ba > Pb. Se manifestaban diferencias significativas en función del sexo en Al, Ba, Cr, Sr, y Zn. Se comparten diferencias con nuestro estudio, únicamente en el caso del Sr y Ba que se muestran más elevadas en el grupo femenino. Aunque en nuestro estudio el Cr no manifiesta diferencias significativas entre los dos sexos, sí se muestra más elevado en los varones al igual que en este estudio, lo que puede obedecer a un mayor número de actividades al aire libre en el varón. Por otro lado, el aumento de diferencias significativas entre ambos sexos especialmente manifiesto en el grupo de edad de 11 a 15 años, mostrándose mayoritariamente elevados distintos parámetros en el grupo femenino, podría obedecer a que el crecimiento óseo se completa en las hembras 2 años antes que en los varones.

Desplazándonos al continente Asiático, en Japón, TaKashi S. et al en el 2000²⁵¹, analizaron muestras de pelo de 418 sujetos de edades comprendidas entre 6 y 20 años mediante ICP-MS y EAA, determinándose en ellas Zn, Cu, Mn y Fe. El Cu y Mn se mostraron significativamente más elevados en el grupo masculino respecto al femenino. Curiosamente, en nuestro caso éstos se manifiestan de manera opuesta. Además, el Mn aparece mucho más elevado que en nuestro estudio. Asimismo, el Zn decrece en el período entre los 6 y 14 años. En nuestro caso el Zn va incrementándose en todos los grupos de edad.

Otro estudio descrito en Asia, fue el llevado a cabo en Korea por Park H-S et al. en 2006²¹⁴, en el que se seleccionaron muestras de pelo de 655 niños de 3 a 6 años de edad, determinado en éstas la concentración de 23 elementos traza a fin de establecer unos Valores de Referencia en esta población. De ellos, 15 eran elementos esenciales nutricionales y 8 elementos tóxicos que se determinaron por ICP-MS. Respecto a nuestro estudio, se observan concentraciones más elevadas en el Se, Cd, As y Pb, junto con concentraciones inferiores en Al, Mn, Cu, Ba, Zn y Hg y por último, niveles similares en Co, Mo y Cr. Asimismo, en éste, el Zn y el Mn mostraban correlaciones positivas con la edad. Sin embargo, en nuestro caso, se

manifiesta una fuerte correlación con el Zn y con otros elementos Se, Sr y Ba de una forma más débil.

La última investigación que se muestra del continente asiático, es desarrollada en Pakistán por Shah F. et al²⁶⁴ en 2010, en un grupo de 132 niños cuyas edades se categorizaron en los grupos de 1 a 5 años y de 6 a 10 años. En éste, claramente se observa un valor mayor de Zn junto con un valor muy inferior de Cu respecto a nuestros hallazgos. Asimismo, se muestra elevado el Cd respecto, no únicamente a nuestro estudio sino, a todos los mencionados en la discusión. Además, cuenta con la peculiaridad de un valor muy elevado de Pb que probablemente obedece a la no restricción del Pb de la gasolina.

Por último, en el continente americano, en Bolivia, se describe la investigación de Barbieri en 2010²³. En su estudio se tomaron muestras de pelo de 242 niños de 7 a 12 años de edad, de diferentes localidades. Las muestras fueron tratadas según el protocolo del IAEA³⁴² y en ellas se determinaron 15 elementos por ICP-MS. Digno de mención resultan las concentraciones tan elevadas de Pb, especialmente en los varones y mucho menos elevadas las de Cd, también fundamentalmente en los varones que podría obedecer al mayor número de actividades al aire libre que desarrollan los niños. Sin embargo, en el caso de las niñas se observó una mayor concentración de Zn y Mn (Tabla 55, únicamente se muestran los valores de los varones). Asimismo, es significativo el valor tan elevado de As que podría deberse a contaminación de las aguas de consumo y los niveles de Zn y Cu que manifiestan unos valores inferiores a los encontrados en otros países.

Finalmente, comentaremos algunas semejanzas existentes entre el presente estudio y el realizada en Alcalá de Henares, Madrid, por González- Muñoz en 2008¹¹³, en un grupo de estudiantes (n: 350) de la universidad de dicha ciudad madrileña, de edades comprendidas entre 20 y 24 años de edad. En este estudio se observó que los niveles de Cd, similares a los encontrados en el nuestro, eran inferiores a los encontrados en otros grupos poblacionales de diferentes países. Sin embargo, el Cd manifestaba niveles superiores en el varón y en nuestro estudio en las hembras. Asimismo, el parámetro Zn no variaba en función del sexo, hecho descrito de igual forma en nuestra investigación. Por otro lado, aun cuando se observaban, en general, niveles superiores en las hembras en ambos estudios, los elementos en los que aparecía diferenciación en función del sexo en este estudio (Ni, Sn, Pb y As) eran distintos a los que se manifestaban en el nuestro. No obstante, aunque no todos los elementos muestran

el mismo comportamiento en ambos estudios, sí se pone de manifiesto que dichos elementos aparecen mayoritariamente en concentraciones más elevadas en el grupo femenino, lo que podría estar relacionado con fenómenos hormonales. Por último, se han observado en ambos estudios un gran número de interacciones/correlaciones entre elementos tanto esenciales como tóxicos (Zn/Cd, Zn/Pb, Zn/Tl, Se/Pb, Se/Tl, Cu/Tl...) reguladas por mecanismos homeostáticos en los que se evidencia la competencia que puede existir entre elementos esenciales y tóxicos

5.2 Consideraciones sobre Mercurio

En el presente estudio se ha obtenido una mediana de mercurio en el cabello de población infantil de 0,97 µg/g (RIC: 0,53-1,73). Siguiendo las directrices establecidas por los grandes estudios de biomonitorización llevados a cabo en la Unión Europea (Alemania, República Checa)^{27,28,126,262} a fin de obtener unos valores de referencia se han empleado los percentiles 5 y 95. De este modo, el intervalo de referencia estimado para el Hg en cabello se encuentra entre (0,13 – 3,95) µg/g.

Las medianas obtenidas en función de las categorías de edad establecidas son las siguientes.

1. Entre 0 y 5 años: 0,90 µg/g.
2. Entre 6 y 10 años: 1,02 µg/g.
3. Entre 11 y 15 años: 0,98 µg/g.
4. Mayores de 15 años: 0,86 µg/g.

El valor máximo encontrado en nuestra población ha sido de 10,86 µg/g. Asimismo, se ha encontrado un 2,5% de resultados por encima de 5,5 µg/g y por tanto, doce niños con valores superiores a este dato.

Merece la pena subrayar que no se han encontrado correlaciones con la edad ni con el sexo. Esto hecho, se ha objetivado al evaluar los resultados de los diferentes estadísticos de contraste empleados en el estudio de los datos, que nos han puesto de manifiesto la no evidencia de diferencias significativas en función de la edad y el sexo. Esta afirmación concuerda con gran número de referencias bibliográficas que posteriormente se comentarán

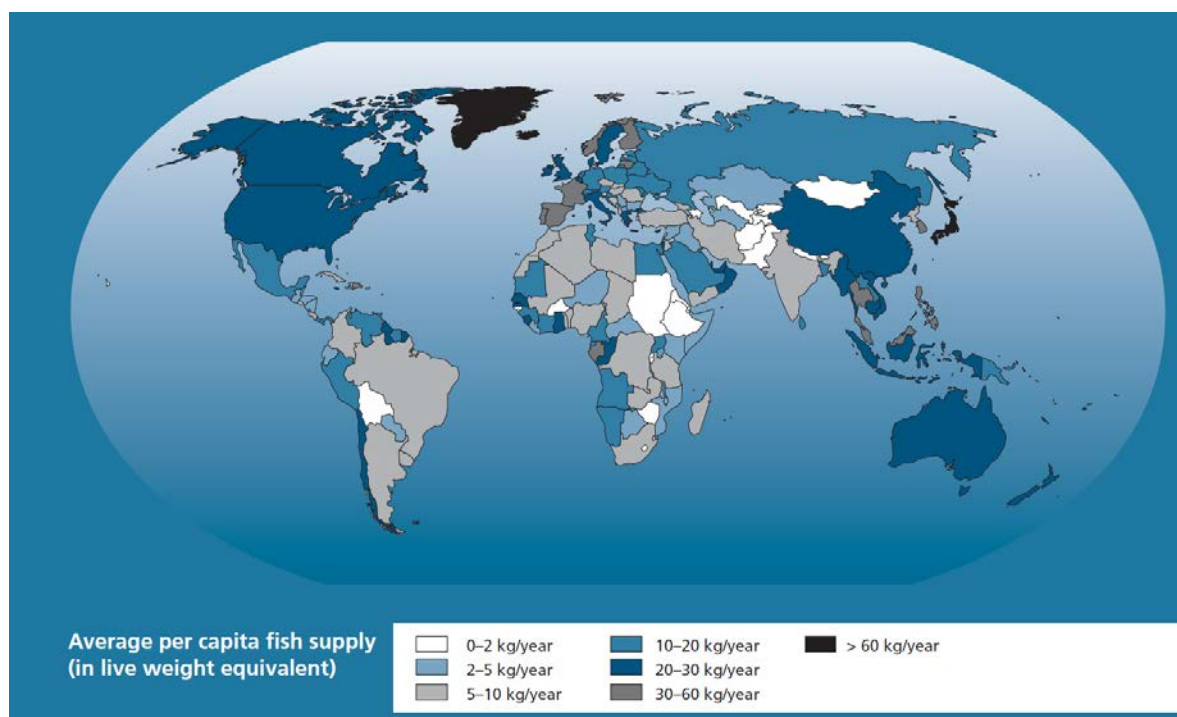
En referencia al consumo de Pescado

España es el país de la Unión Europea con más kilómetros de litoral costero, ello motiva la gran tradición de consumo de productos de la pesca que existe en nuestro país. Según datos de la FAO ⁹³ (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación) en el 2007, España era el 2º país en referencia al consumo de pescado después de Japón

Asimismo, según los datos que obran en poder del Ministerio de Medioambiente Rural y Marino el consumo anual de pescado per cápita en España en el período de Julio 2007 a Junio 2008 fue de 36 kg¹⁸⁹. Datos que se encuentran significativamente alejados de la media mundial de consumo per cápita que para este período resultaba ser de 22 Kg.

A nivel Europeo en los estudios de nutrición “EPIC”^{255,324} “*European Investigation into cancer and nutrition*” llevados a cabo en 10 países del viejo continente, en el período comprendido entre 1992 y 2000, se exponía la existencia de una gran variabilidad en el consumo de pescado entre los diferentes países. En el ranking de consumo se situaba España en el primer lugar, siendo el país con consumo per cápita más elevado y Alemania en última posición. Por otro lado, los países escandinavos, son considerados unos grandes consumidores de pescado, debido este hecho, únicamente, al consumo de pescado graso (arenque, salmón, bacalao...). En ese mismo sentido, se ha constatado que son los países centroeuropeos los menos consumidores y los mediterráneos los grandes consumidores.

Figura 46 Distribución del consumo per cápita mundial de pescado 2007



Fuente: (FAO)

En octubre de 2001 a varios estados miembros de la Unión Europea se les invita a participar en el proyecto de cooperación científica (SCOOP)⁸⁶ para la evaluación de la exposición dietética de su población a diferentes metales tóxicos entre ellos el mercurio. El objetivo del proyecto era establecer las bases científicas para la evaluación y manejo del riesgo para la salud procedente de la exposición a arsénico, cadmio, plomo y mercurio a través de la dieta. En éste, participaron Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Irlanda, Italia, Holanda, Noruega, Portugal, Suecia y Reino Unido. Los resultados indicaban que aunque la mayoría de los países tenían ingestas por debajo del PTWI, existían grupos poblacionales con un alto consumo de pescado y productos marinos que podrían tener ingestas de mercurio muy próximas o incluso superiores al PTWI de 1,6 µg/kg peso corporal.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos del proyecto SCOOP y la PTWI establecida por la JECFA, el 18 de Marzo de 2004, la Comisión Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA)⁹² inicia las recomendaciones en los grupos *vulnerables* (mujeres embarazadas, madres lactantes y niños) sobre el consumo de mercurio a través del pescado, dado que su ingesta, gracias al MeHg que contienen, podría aumentar el riesgo de lesión en el SNC fetal e infantil.

Asimismo, esta ampliamente constatado que la principal fuente de exposición a metilmercurio es la ingestión de pescado contaminado.

En España se han realizado en la última década diferentes estudios de frecuencia de consumo de pescado que estiman, en función de dicho consumo, la ingestión de MeHg en la población a estudio.³⁰⁹

Así, Marti-Cid^{176,177} y colaboradores, en Cataluña, realizaron una encuesta de frecuencia de consumo de pescado en 12 ciudades durante el período de estudio 2000-2002. En ella, afirmaban que en los varones el consumo era mayor. Además, asumían que al consumir los niños mayor cantidad de pescado que los adultos dado su menor peso corporal presentaban una mayor exposición al MeHg. Finalmente, determinaban que la mayor concentración de MeHg se encontraba fundamentalmente en el emperador y el atún.

En un estudio de Rubio²⁴⁵ y colaboradores llevado a cabo en la Comunidad Canaria en 2007. Se emplearon los datos de la Encuesta Nutricional Canaria, ENCA, establecidos en base a un cuestionario de frecuencia de consumo de pescado. En éste, se constataba el menor consumo de pescado respecto a otras comunidades españolas, y al mismo tiempo, se afirmaba la menor presencia de Hg en el tipo de pescado consumido habitualmente por su población.

Paralelamente a los estudios anteriores, en Murcia se desarrolló el proyecto Hermes^{211,212} en el período comprendido entre 2006 y 2007. En éste, se estimaba la ingesta de MeHg a través de un cuestionario de frecuencia de consumo de pescado en un grupo de población de niños menores de 10 años. De sus resultados se infería que aproximadamente un 54% de los niños murcianos ingerían una concentración de MeHg superior al límite de PTWI establecido por JECFA en 1,6 µg/Kg de peso corporal /semana. Por otro lado, concluían que el atún rojo y el pez espada constituían el 68% del pescado ingerido por su población.

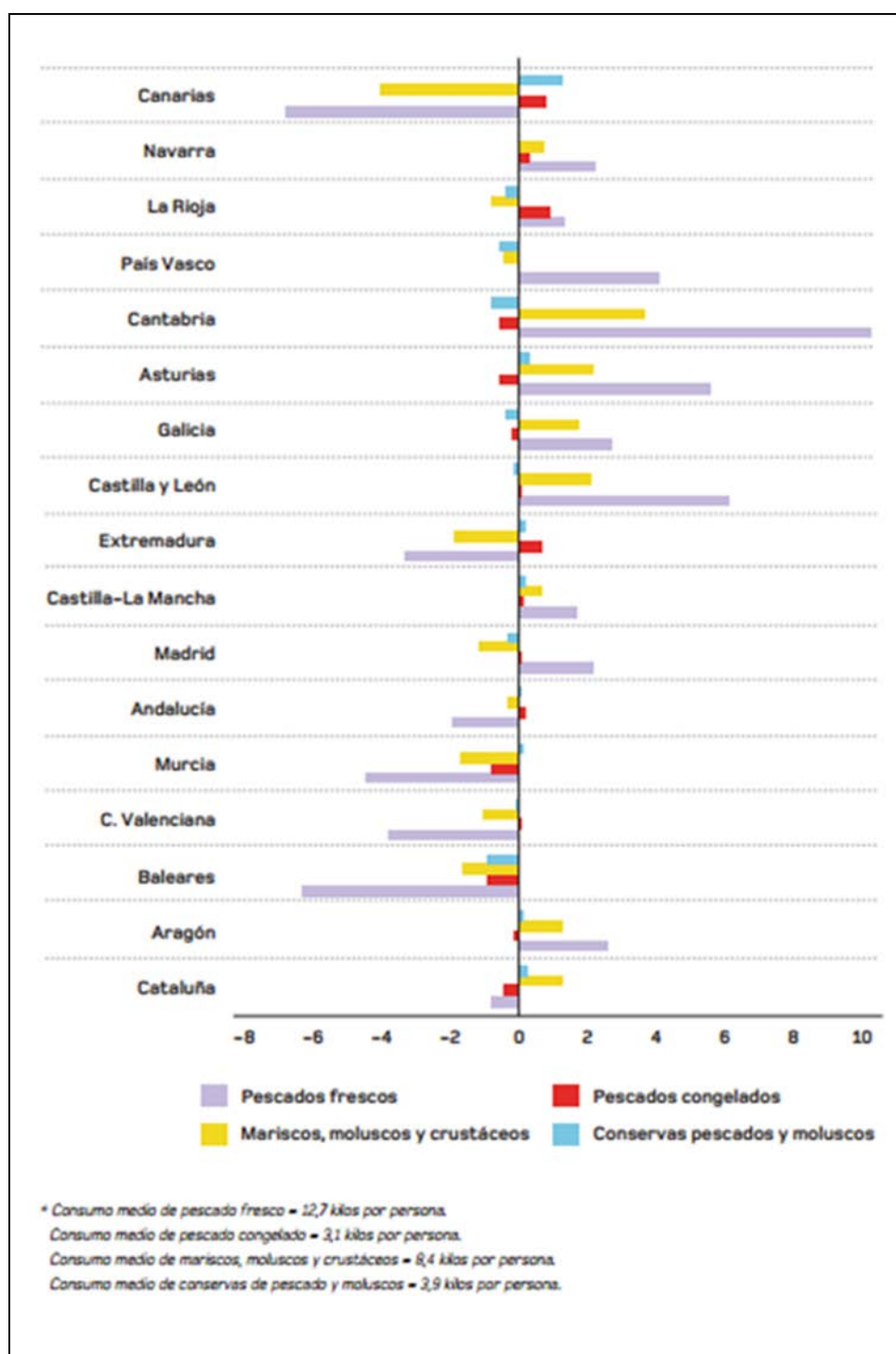
A nivel nacional, en el año 2007, fue realizado este mismo tipo de estudio gracias a Sahuquillo²⁴⁹ y colaboradores. De nuevo, se ponía de manifiesto que en relación a su peso corporal los niños consumen mayor cantidad de pescado y, por tanto, adquieren mayor concentración de MeHg que los adultos. Asimismo, se constataba la gran variabilidad en el

consumo de pescado en función de la especie, su procedencia...datos éstos que concuerdan con los obtenidos en el proyecto SCOOP⁸⁶ realizado a nivel Europeo. En este sentido, se objetivaba que las especies que presentaban mayor concentración de MeHg eran atún rojo, pez espada, tiburón...Inclusive, se evidenciaba que dentro del atún, el rojo, presentaba mayor MeHg que el atún amarillo. Además, sorprendía que dependiendo de la procedencia de la captura de la pesca el nivel de MeHg podía variar. Esto se puede explicar considerando que en el mar Mediterráneo existen grandes depósitos de mineral cinabrio (mineral en cuya composición abunda el Hg). De ello, se infiere que el pescado procedente del mar Mediterráneo presenta niveles más elevados de Hg que aquel que procede del Atlántico.

Por último, merece la pena contrastar estos estudios con los datos obtenidos del Ministerio de Medioambiente Rural y Marino¹⁸⁹ referidos al consumo anual de pescado per cápita en España, en el período establecido, que clarifican que las comunidades más consumidoras de pescado son Cantabria, Asturias, País Vasco, Castilla y León, Madrid, Aragón y Navarra.

Finalmente, los datos aportados por el MARM¹⁸⁹ representados anteriormente de forma gráfica coinciden, al menos parcialmente, con los resultados obtenidos en el estudio EPIC^{255,324}, dado que dicho estudio EPIC se encontraba limitado a un número de comunidades autónomas determinado.

Figura 47 Diferencias en el consumo de productos del mar por comunidades autónomas (Desviación, en kilos, con la media nacional)



Desplazándonos a otro ámbito, en España se han realizado, únicamente, unos pocos estudios en población infantil en relación con el Mercurio. En este sentido, no se puede dejar de comentar el ambicioso proyecto de investigación INMA (Infancia y Medio Ambiente)²⁸⁵. Dicho proyecto se construye sobre una red de grupos de investigación que tiene como objetivo estudiar la relación entre los contaminantes ambientales más importantes presentes en el agua de consumo y baño, en el aire y en los alimentos de nuestra dieta junto con el crecimiento y desarrollo del niño. El proyecto inicia su andadura con la experiencia adquirida en el estudio piloto llevado a cabo en tres cohortes sitas en Ribera del Ebro, Menorca y Granada. Los objetivos que intentaban alcanzar dichas cohortes abarcaban desde el desarrollo neuroconductual hasta los efectos reproductivos o el efecto de los contaminantes atmosféricos junto con alérgenos en el asma. Posteriormente se crearon las 4 cohortes “de novo” de madres-niño emplazadas en Valencia, Sabadell, Asturias y Guipúzcoa. Los estudios que comenzaron entre el 2006-2007, fueron realizados durante el embarazo, en el nacimiento, cuando el niño tenía un año y a los 4 años de edad.

En la primera publicación de Ramón R²³³ en 2007, ven la luz los datos referidos a la cohorte de Valencia obtenidos después de analizar sangre de cordón de los recién nacidos, inicialmente 253 para finalmente alcanzar los 554 y administrar un cuestionario de frecuencia de consumo de pescado de 6 ítems (No consumen, 1-3 porciones/mes, 1 vez/semana, mayor de 2 veces/semana, 3-4 v/semana y mayor de 4 veces/semana). En ésta, se contaba con un número de casos inicial (n:253), que se obtiene una media geométrica GM de THg en sangre de cordón de 9.8 µg/L y una mediana de 10 µg/L y RIC (5.8-18). En ella, el MeHg era considerado el 90% del Hg total THg. (MaHaffey, 2005)¹⁷².

En este mismo sentido, es conocido que la EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente de los EEUU), estableció la Dosis de Referencia de Ingestión de MeHg (RfD) en 0,1 µg/kg peso/día en 1997. Estos valores se corresponden con unos niveles de mercurio en sangre de cordón de 5.8 µg/L y en pelo de 1 µg/g^{310,327,338}. De ello se deduce que el 75% de los recién nacidos del estudio citado presentaba valores superiores a los 5.8 µg/L establecidos por la EPA.

Los resultados aportados en dicho estudio se corresponden con los manifestados por países con elevada frecuencia de consumo de pescado como Japón, Taiwán o Hong Kong. En este orden, Sakamoto et al (2007)¹²² referían GM de 9.8 µg/L y RIC (6.96-13.6), Hsu et

al. (2007) mostraban GM de 9.2 µg/L y RIC (5.8-18) y por último, Fok et al. (2007) referían Mediana de 8.8 µg/L y RIC (6.3-12.3).

Por otro lado, en las islas Feroes, en 1997, Grandjean et al,¹¹⁷ describían un MeHg de GM de 22.9 µg/L y RIC (13.4-41.3) y más tarde, Stewerwald et al (2000) mostraban algo similar para el Hg con una GM de 20.4 µg/L y un RIC (11.8-40) µg/L.

En España, entre los pocos datos existentes, se ha encontrado un estudio realizado por Soria et al. en 1992, para una población un tanto escasa (n: 24), donde se informaba una GM de 6.4 µg/L y un RIC (2.0-15.1)

A su vez, en el estudio de Ramón R, se observa con claridad que el nivel de THg, en sangre de cordón, procedente de madres que consumían pescado, con una frecuencia superior a 2 veces por semana, duplicaba a la concentración de THg presente en sangre de cordón procedente de madres no consumidoras de pescado. Curiosamente, en nuestro estudio ocurre algo similar, inclusive mas significativo, entre el Hg encontrado en el cabello de aquellos que consumen más de 4 veces/semana con respecto a los que no consumen. Así, se ha visto un nivel de Hg que puede llegar a duplicarse (de 0.4 a 1.1 µg/g) e incluso a triplicarse (de 0.8 a 3.34 µg/g)

Como se ha citado anteriormente, en la 2ª publicación de Ramón R et al^{231,232}, en 2010, en la misma cohorte de Valencia, en la que se amplía el número de casos hasta (n: 554), se obtiene una ligera variación de la media geométrica que pasa a ser GM 9.5 µg/L y 95% del intervalo de confianza CI (2.0-15.1). Asimismo, en relación a otras investigaciones descritas en la bibliografía, se observan datos similares a los aportados por países con elevada frecuencia de consumo de pescado como Japón, Taiwán, Hong Kong. Sin embargo, respecto a países muy poco consumidores de pescado (USA, países centroeuropeos...), parecen los datos de Ramón R et al. ser mucho mas elevados. Así, por ejemplo, se observa en los obtenidos por Lederman et al., en 2007 en Estados Unidos en el que informaba de una GM de 4.4 µg/L y un RIC (0.1-63) µg/L. Lo mismo sucede con países Centro Europeos como Polonia y Suiza donde según Bjornberg et al³² en 2003 la GM obtenida es 1.3 µg/L y un RIC (0.1-57) µg/L. y Jedrychosky et al en 2007 muestran una GM de 0.8 µg/L y un RIC (0.1-5) µg/L.

Respecto a los resultados finales de los estudios epidemiológicos de las 4 cohortes del proyecto INMA, los datos muestran elevadas medias geométricas y medianas en todos los casos: en Valencia GM: 9.5 µg/L, en Sabadell GM 6.3 µg/L, en Asturias 10.8 µg/L y en Guipúzcoa 3.8 µg/L. La media geométrica resultante final era de GM 8.2 µg/L que equivale a una mediana de 8.5 µg/L. Estos datos correlacionan con las aseveraciones que indican que en España hay una gran tradición de consumo de productos de la pesca y de entre ellos, un gran consumo de pescado con elevados niveles de MeHg, que encuentran su máxima representación en el atún, emperador...Paralelamente, esto ha sido manifestado por diferentes autores como Batista et al. 1996; Soria et al. 1992; Guallar et al¹²¹. 2002; Stay Healthy et al. 2007; Ramón y Ballester²³¹ 2008; Díez et al⁶⁴. 2009 y Freire et al¹⁰⁴. 2010.

En este mismo periodo, Díez et al.⁶⁴ en 2008, colaboradores del proyecto INMA, informaban de los resultados de las investigaciones llevas a cabo en 4 grupos de población infantil de diferentes áreas de nuestra geografía: Madrid (n: 57), Sabadell (n: 25), Menorca (n: 65) y Ribera del Ebro (n: 71). El número total de casos presentados fue n: 218, diferenciados en 2 grupos de edad, recién nacidos (n: 75) y preescolares de 4 años (n: 136). Cada pareja madre – niño fue sometida a un cuestionario de frecuencias de consumo de pescado, el mismo que había sido de aplicación en todas las investigaciones del proyecto INMA. Este estudio fue realizado en muestras de cabello dado que es ampliamente aceptado que la concentración de MeHg en pelo es un fiel reflejo del nivel de MeHg en sangre circulante. En este sentido, es ampliamente aceptada la estimación de que el ratio pelo - sangre es 250 : 1 (IPCS 1990) ¹³⁹ .

Por otro lado, tras el escrutinio de los resultados del cuestionario y en aras a facilitar la interpretación de los mismos se realizó una transformación de los resultados quedando finalmente reducidos a 4 las categorías de frecuencia de consumo de pescado que son las siguientes: categoría 1: nunca (6%); categoría 2: 1-2 veces/semana (56%); categoría 3: 3-4 veces/semana (23%) y categoría 4: mas de 4 veces/semana (15%)

Estas categorías coinciden plenamente con las elegidas en nuestro estudio. Sin embargo, no ocurre lo mismo con los porcentajes de frecuencias obtenidos en las diferentes categorías. Siendo éstos, en nuestro estudio, los siguientes: nunca (18.6%); categoría 2: 1-2 veces/semana (40%); categoría 3: 3-4 veces/semana (40%) y categoría 4: mas de 4 veces/semana (1.3%).

La concentración de THg en el grupo de prescolares establecida como media aritmética MA era de 0.94 (0.19-5.63) $\mu\text{g/g}$. Asimismo, se ha objetivado que esta concentración es muy variable en función del área geográfica elegida y por ende, en función de las diferencias consumo de pescado en las distintas áreas como ya se había reflejado anteriormente en la datos obtenidos del Ministerio de Medioambiente Rural y Marino. Así, el resultado del THg de los 2 grupos (recién nacidos y prescolares) expresado en MA era: 1.416 $\mu\text{g/g}$ (Desviación Standart DE: 1.387). En las diferentes áreas geográficas los resultados fueron los siguientes:

Menorca: Media Aritmética: 0.706 $\mu\text{g/g}$ (DE: 0.66).

Rivera del Ebro: Media Aritmética: 1.093 $\mu\text{g/g}$ (DE: 1.016).

Madrid: Media Aritmética: 1.417 $\mu\text{g/g}$ (DE: 0.901).

Sabadell: Media Aritmética: 1.999 $\mu\text{g/g}$ (DE: 1.925).

Merece la pena significar que la concentración de THg en el grupo de prescolares MA 0.94 $\mu\text{g/g}$, IC (0.19-5.63) $\mu\text{g/g}$, es similar a la encontrada en nuestro estudio en el grupo de 0-5 años Mediana 0.90 $\mu\text{g/g}$, RIC (0.43-1.90) $\mu\text{g/g}$.

Asimismo, se ha de comentar que en esta investigación el grupo de prescolares que consumía pescado más de 4 veces/semana presentaba una concentración prácticamente 3 veces superior a la del grupo que no consumía pescado, véase 1.40 $\mu\text{g/g}$ versus 0.4 $\mu\text{g/g}$. Estos datos se corresponden con lo acaecido en nuestro estudio donde el grupo de grandes consumidores de pescado mostraba una mediana de 1.87 $\mu\text{g/g}$ versus el grupo de no consumidores con una mediana de 0.4 $\mu\text{g/g}$.

Otro dato que merece la pena destacar, es el porcentaje de resultados superiores a los límites establecidos por la EPA en función la Dosis de Referencia de Ingestión de MeHg (RfD) de 0,1 $\mu\text{g/kg}$ peso/día (US-EPA 1997), correspondientes en pelo a 1 $\mu\text{g/g}$ ^{310,327,338}. Este porcentaje, en este estudio, equivalía a un 42% de los prescolares mientras que en el nuestro se aproximaba a un 48% de los niños de 0-5 años.

De estos datos, se debe significar en ambos estudios la relación claramente existente entre la concentración de Hg encontrada en el cabello y el incremento del consumo de

pescado En ambos estudios se muestra una correlación significativamente positiva que en el primero se manifiesta con una R^2 : 0.246 y en el nuestro de R^2 : 0.267

Por otro lado, obviamente entre ambos estudios aparecen algunas discrepancias. En este estudio se manifiesta, aunque débilmente positiva, una correlación ente la concentración de Hg y la edad. Sin embargo, en nuestro estudio no aparece ninguna relación entre la concentración de Hg y la edad de los individuos. En este sentido, en la bibliografía se encuentran referencias al aumento de la concentración de Hg con la edad. Así, en el trabajo de investigación llevado a cabo por Elena Trasobares en Madrid²⁷⁷ en 2009, en población adulta trabajadora del Hospital Clínico de Madrid se observaba un aumento del consumo de pescado con la edad que probablemente explicaría la tendencia al aumento paralelo de la concentración de mercurio en sangre. En otras investigaciones realizadas en población adulta se observa, del mismo modo, un incremento del nivel de Hg con la edad. De hecho, Yasutake et al en un estudio realizado en Japón entre 1999 y 2002 ponían de manifiesto el aumento de los niveles de Hg en la etapa adulta (a partir de los 20 años) llegando a un pico máximo en el período entre los 50 y 60 años. Dato éste avalado por otros estudios realizados en el Japón por Yasuda et al 2005, Tetsuya et al²⁸⁸. 2009, Nakagawa et al. 1995, Endo T et al 2009⁷⁹. Asimismo, en otros países mediterráneos tales como Grecia, Elharmi et al. en 2007 constaban la relación con la edad, al igual que en Italia, Díez et al⁶⁵ en 2007 suscribían el mismo hecho.

Otro hecho que no concuerda con nuestro estudio es la diferenciación varón – hembra. En nuestro caso, no se ha encontrado diferencia entre ambos sexos. En este caso en la hembra aparecía mayor concentración de Hg que en el varón (1.06 $\mu\text{g/g}$ vs 0.73 $\mu\text{g/g}$). Similares resultados fueron informados por Batista et al en 1996. Sin embargo en la bibliografía se pueden encontrar afirmaciones de todo tipo; desde la no manifestación de diferencia en función del sexo como ocurre en el trabajo de investigación llevado a cabo por Elena Trasobares²⁷⁷ en Madrid en 2009, en población adulta trabajadora del Hospital Clínico de Madrid; hasta la presencia de diferencias. Así, Yasuda et al en 2005 y otros estudios mencionados anteriormente, manifiestan niveles de Hg mayoritarios en la hembra. Finalmente, en otros se muestran niveles mayoritarios de Hg en el varón como aparecen reflejados en lo estudios de Díez en Italia⁶⁵ y, Elharmi en Grecia, ambos en 2007.

Tabla 56 Concentración de mercurio en pelo y otras muestras en diferentes estudios

Referencia	Muestra	Año	N	Edad	Matriz	MA(DE)/GM/M (RIC)	Factores asociados
AMÉRICA							
EE UU							
						THg M:0.11 µg/g	
McDowell M.A./Environ Health Perspect 2004;112:1165-1171	Nacional NHANES Longitudinal	1999-2000	838	Niños 1-5	CABELLO	No consumen: 0.08 1-2 veces/mes: 0.12 3 ó +veces/mes: 0.14	Consumo de pescado (p<0,05)
BRASIL							
Marques R./Regul	Amazonia	2007+	82	Niños:	CABELLO	T Hg: µg/g MA	Consumo de pescado (p<0,05)
Toxicol Pharmacol	Longitudinal			Recién nacidos		Recién nacidos:	Si THg>1 µg/g

2007;49;17-24

6 meses

MA 2.4(DE:3.0)

< CI (0.7)

36 meses

6 meses: 3.8(5.5)

60 meses

36 meses: 2.6(3.7)

60meses: 2.6(3.5)

ASIA

KOREA

Kim SA./ Scienc

NHIC; 2006

Niños 1-6

Total Environ 2008

Programa Promoción
Salud

2008+

114 Madres

Niños 30

CABELLO

THg M:0.59 µg/g

Consumo de pescado
(p<0,05)

402:36-42

Longitudinal

114 niños

Niñas 62

RIC(0.46-0.89)

17.5%> EPA(1 µg/g)

CHINA

Lei Zhang/ Environ Geochem
Health

Transversal

2006+

108

5-73

CABELLO

THg µg

MA:0.59 µg/g

2006;28:67-71

(1-15años)

GM: 0.45 (0.18-2.24) µg/g

JAPÓN

THg GM :1.82 µg/g

Varón

Yasutake A/J. Health Scienc
2004;50;120-125

Transversal

1999-2002

8665

1-89

CABELLO

GM: 2.42 µg/g

Consumo de pescado
(p<0,05) Edad, Sexo
(p<0,05)

Hembra:

GM: 1.37 µg/g

EUROPA

ESPAÑA

Díez S/ Arch Environ

Cohorte Madrid

n:57

Contam Toxicol

Cohorte Sabadell

n:25

Recién nacidos

Prescolares:

Consumo de pescado
(p<0,05) Edad, Sexo
(p<0,05)

Proyecto INMA

Cohorte Menorca

2008

n:65

Prescolares 4
Años

CABELLO

THg µg/g

42% > EPA(1 µg/g)

Cohorte Rivera Ebro

n:71

MA: 0.94(0.19-5.63)

2009: 56; 615-622

Longitudinal

Total : 218

Ramón R/ Environ Internat 2011;37: 597-604	Proyecto INMA						
	Cohorte Valencia	2003-2008	554	Recién nacidos	Sangre Cordón	GM: 9.5 µg/L /M: 9.5 µg/L MeHg 90% de THg	> consumo pescado > THg
	Longitudinal						
	Cohorte Sabadell	2004-2007	460	Recién nacidos	Sangre Cordón	GM: 6.3 µg/L /M: 6.4 µg/L MeHg 90% de THg	> consumo pescado > THg
Ramón R/ Environ Internat 2011;37: 597-604	Cohorte Asturias	2004-2008	340	Recién nacidos	Sangre Cordón	GM: 10.8 µg/L /M: 12 µg/L MeHg 90% de THg	> consumo pescado > THg
	Cohorte Guipúzcoa	2006-2008	529	Recién nacidos	Sangre Cordón	GM: 7.5µg/L /M: 8.1 µg/L MeHg 90% de THg	> consumo pescado > THg
Freire C/Environ Research 2010;110:96-104	Cohorte Granada	2002-2006	72	Prescolares 4 años	CABELLO	THg µg/g GM: 0.96(0.76-1.20)/ M:1.04	Consumo de pescado (p<0,05) >1 µg/g < MSCA
	Longitudinal						Área cognitiva, memoria, verbal
A.Castaño et al / Toxicol Lett 2008;	Madrid	Junio-Septiembre	267	21-69	CABELLO	GM: 2,23 µg/g	Edad y consumo de pescado
			Hombres:56				

180 (1): S79-S80	Local	Transversal	2007	Mujeres: 211				
Aragónés N/Gac Sanit	Proyecto BIoMadrid			145 tríos	Recién nacido		THg µg/L	
2008; 22(5):483-91	Madrid	2008		Hombre	Sangre cordón		GM: 6.73	
	Transversal			Mujer				
ITALIA								
S. Díez et al. / Environ Int				237				
2008; 34:162–167	Local(Nápoles)	2005-2006	Hombres:115	35-45	CABELLO	MA: 0,63 µg/g (0,38)	Consumo de pescado (p<0,05) Edad, Sexo (p<0,05)	
			Mujeres: 122			M: 0,57 µg/g		
GRECIA								
D. Gibičar et al. / Sci Total Environ						THg		
2006; 367:586–595	Local (Aegan Islands)	2006+	Mujeres: 246	17-46	CABELLO	GM: 1,36 µg/g (0.046-17.5)**	Consumo de pescado(p<0,05)	
	Transversal					MeHg: 1.07(0.031-16.2)**		

ALEMANIA

						THg
Pesch A/ J. Expos Ana			N:245			
Env Epid	1996	121: niños	8-10	CABELLO		GM:0.18 µg/g (0.06-1.7)**
2002; 12: 252-258		124: niñas				M: 0.18 µg/g

AFRICA

MARRUECOS

						THg µg/g
Elhamri H/Food Aditiv			N:108			M: Total: 1.46 (0.9-5)
Contam.	Costa Mediterránea	2001	Varón:68	10-19	CABELLO	Varón: 1.71
2007; 24(11):1236-1246	Transversal		Hembra:40			Hembra: 1.18
						10-19: GM :0.60

MA: Media aritmética; DE: Desviación estándar; GM: Media geométrica; M: Mediana; +: Año de publicación

En relación a otras investigaciones internacionales se observan datos similares a los aportados por países con elevada frecuencia de consumo de pescado como puede ser Japón. Así, en el estudio de Murata et al realizado en niños de 7 años, en 2002^{199,200}, se muestra una MA de Hg en pelo de 1.64 µg/g. Por otro lado, y respecto a países muy poco consumidores de pescado (USA, países centroeuropeos...) los datos proporcionados en éste, parecen ser mucho más elevados que los obtenidos por McDowell et al¹⁷⁹, en 2004, en niños de 1-5 años en Estados Unidos en el que informa de una MA de 0.22 µg/g y un RIC (0.18-0.25) µg/g. Lo mismo sucede con países Centro Europeos como Alemania donde según Pesch et al²²¹ en 2002, en niños de 8-10 años, la MA obtenida era 0.23 µg/g y un RIC (0.06-1.7) µg/g. Además, respecto a Estados Unidos, se observa de los resultados citados que, tanto en nuestro estudio como en el referido anteriormente, los niveles de Hg encontrados en pelo son hasta 5 veces superiores a los que se manifiestan en Estados Unidos en el estudio de biomonitorización de la población NHANES. Sin embargo, estos niveles se encuentran muy por debajo de los obtenidos en los estudios epidemiológicos de las Islas Feroe (Niños de 7 años presentaban una MA de 2.99 µg/g)^{117,119,197} y también de las Islas Seychelles (Niños de 5-6 años presentaban una MA de 6.5 µg/g).

Finalmente y de nuevo en España, fruto de los resultados obtenidos es importante destacar que, en el estudio de Díez^{64,66} y en el nuestro, se constata que más de un 40% de nuestros niños consumen pescado dos o más veces por semana. Esto, probablemente, supondría en función del tipo de pescado consumido, que con frecuencia en el caso de los niños es pez espada, atún, etc. una concentración de Hg en pelo superior a la concentración límite establecida por la EPA de 1 µg/g.

Paralelamente a los estudios citados del proyecto INMA, otros colaboradores del mismo, Montuori et al¹⁹³. en 2006, informaban de los resultados de las investigaciones llevadas a cabo en 2 áreas diferentes de nuestra geografía: Menorca (n: 65) y Ribera del Ebro (n: 70). El número total de casos presentados fue n: 130 para una población preescolar de 4 años. La peculiaridad de éste, radicaba en que la población sita en la Ribera del Ebro se encontraba cercana a una planta de cloro-álcali liberadora de Hg. La media aritmética de todos los resultados obtenidos fue de 0.723 µg/g (DE: 0.943). En los resultados se manifestaban diferencias significativas en la concentración de MeHg en pelo entre el grupo

de estudio de Menorca y el de Ribera del Ebro. Así, la mediana de ambos era 0.37 µg/g vs 0.63 µg/g.

En contraste con nuestros datos, en este estudio quedaba patente la diferencia en razón del sexo. De hecho, los niveles de Hg en las niñas eran significativamente superiores a los de los niños.

Asimismo, considerando la evaluación de la encuesta de consumo de pescado se constataba que aquellos que consumían pescado más de 3 veces por semana presentaban unos valores de Hg en pelo significativamente superiores a los que no consumían o lo hacían menos de dos veces por semana.

Por otro lado, aunque en España las investigaciones encontradas no han sido muchas, en Madrid, se han publicado los resultados de un estudio piloto, proyecto BioMadrid, llevado a cabo por Aragonés N et al. en 2008²⁷⁷ y avalado por la consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. Se trata de un estudio descriptivo transversal que permite explorar el grado de exposición a los posibles contaminantes ambientales realizado en una muestra de tríos (padre, madre e hijo). El estudio se realiza a fin de que los datos aportados permitan evaluar las tendencias de la exposición a estos contaminantes en nuestro medioambiente. Los resultados del THg en sangre han sido los siguientes: en el hombre GM 5.38 µg/L, en la mujer GM 3.88 µg/L y en el Recién nacido en sangre de cordón GM 6.73 µg/L.

Asimismo, en este mismo periodo de tiempo, en Madrid, Castaño A. et al, entre Junio y Septiembre de 2007, desarrollaron el proyecto cuyo objetivo era determinar valores de referencia de varios biomarcadores de exposición a tóxicos en la población adulta española (proyecto Bioambient.es)²⁷⁷. En este estudio participaron 267 voluntarios, 56 hombres y 211 mujeres, entre 21 y 69 años y se determinó la concentración de mercurio en cabello, siendo la media geométrica obtenida de 2,23 µg/g.

Otros resultados similares en población adulta en Madrid fueron los mostrados por López-Colón JL en 2003. En su tesis doctoral se determinó la concentración de mercurio en sangre en 186 voluntarios sanos, 113 hombres y 73 mujeres con una edad media de 45 años (15-84 años). Se halló una mediana de 6,1 µg/L, encontrándose un valor máximo de 33,9 µg/L y un valor mínimo de 0,7 µg/L. Se observó también una correlación positiva estadísticamente significativa con el consumo de pescado ($r = 0,438$; $p < 0,001$). Si aplicamos

la fórmula propuesta por el NRC para estimar la concentración de mercurio en cabello a partir de la de la sangre ($[\text{Hg cabello}] = [\text{Hg sangre}] \times 250/1000$)²⁰³ obtenemos en este estudio una mediana de concentración de mercurio en pelo de 2,28 µg/g.

Finalmente, merece la pena introducir en esta discusión uno de los pocos estudios realizados en España por Freire et al¹⁰⁴, en 2009, para valorar la influencia de la exposición al Hg en el desarrollo cognitivo. El estudio se centraba en una cohorte de niños (n: 72) en la provincia de Granada. A la edad de 4 años se determinó la concentración de THg en pelo junto con el consumo de pescado que fue evaluado con un cuestionario de frecuencias de consumo. El test *McCarthy Scales of Children's Abilities* (MSCA) se utilizó a fin de evaluar las habilidades motoras y cognitivas de los niños.

La concentración de THg encontrada en pelo expresada como media geométrica fue de GM 0.96 µg/g, con una mediana de 1.04 µg/g. Valor éste muy similar al encontrado en nuestro estudio de 0.90 µg/g. Además, en función del consumo de pescado se observaban diferencias entre el grupo que consume pescado mas de 3 veces por semana y aquel que consume menos de 3 veces por semana. GM (1.04 µg/g vs 0.83 µg/g).

Por otro lado, encontraron que una concentración de THg en pelo superior a 1 µg/g se asociaba con una disminución en la puntuación del MSCA en el área cognitiva (disminución de aproximadamente 6.5 puntos), la memoria (disminución de 8.4 puntos) y el área verbal (disminución de 7.5 puntos). De hecho, en este estudio se establecía una significativa asociación negativa entre la exposición a THg y el desarrollo cognitivo de los niños. Estos hechos concuerdan con otros descritos en la bibliografía evidenciados tanto en las Islas Feroes (alteración lenguaje – memoria. Grandjean et al 1997) como en USA (alteración visual- memoria. Oken et al 2005 ²⁰⁶) y en el Amazonas (alteración visualespacial. Chevrier et al. 2009 ⁵⁰; Cordier et al, 2002)^{67,100,215}

Como se ha quedado de manifiesto hasta el momento, un aumento de la concentración de mercurio en sangre/pelo a medida que aumentaba la frecuencia de consumo de pescado es consistente con los resultados de otros estudios. Por ello, en la última parte de esta discusión hemos querido comparar la concentración de mercurio en pelo encontrada por nosotros con la de otros estudios internacionales realizados

fundamentalmente en población infantil y en algunos casos en población adulta, siendo algunos de ellos mostrados en la tabla 56.

Es necesario significar que los hallazgos de nuestro estudio son comparables con los de otras comunidades con consumo elevado de pescado como se ha ido poniendo de manifiesto a lo largo de la discusión. Así en el continente asiático, Japón, fue considerada por la FAO ⁹³ en 2007, mayor consumidor anual de pescado a nivel mundial, llegando a alcanzar su consumo per cápita los 65 kg. En un estudio llevado a cabo por Yasutake et al ³³⁸, entre 1999 y 2002, se determinó el contenido de mercurio en cabello de 8655 sujetos (4274 hombres y 4391 mujeres). Los individuos se seleccionaron en centros de belleza, peluquerías y escuelas de primaria en 9 prefecturas: Miyagi, Chiba, Nagano, Wakayama, Tottori, Hiroshima, Fukuoka, Kumamoto y Okinawa. Se les administró un cuestionario que recopilaba información sobre la edad, sexo, frecuencia y cantidad de consumo de diferentes tipos de pescado y la utilización de tintes capilares artificiales. El análisis de regresión múltiple reveló que los niveles de mercurio se correlacionaban significativamente con el sexo, la edad, la ingesta diaria de pescado, la preferencia por pescados como el atún y el bonito y el uso de tintes capilares artificiales. La media geométrica de la concentración de mercurio fue de 1,89 µg/g siendo superior en los hombres respecto a las mujeres (2,42 µg/g vs 1,37 µg/g). La diferencia estadísticamente significativa puede deberse en parte a que el tioglicolato presente en los tintes elimina parte del mercurio del cabello y se teñía el cabello el 48% de las mujeres frente al 10% de los hombres. Se observó un valor mínimo de 0,02 µg/g y un valor máximo de 29,37 µg/g. Asimismo, Japón es el mayor consumidor de atún en el mundo, representando la tercera parte del mercado mundial de atún, lo que probablemente explique estas cifras tan elevadas de THg y que el 87% del total de participantes tengan concentraciones de mercurio en el cabello superiores a 1µg/g. Por otro lado, si se considera el PTWI de la JECFA de 1,6 µg/kg de peso/semana que se corresponde en cabello con 2,2 µg/g, se puede observar que el 47% tienen concentraciones superiores a esta cifra. Dentro del grupo de mujeres en edad fértil (15-49 años), se halló que el 73,7% tenían concentraciones de mercurio en cabello superiores a 1 µg/g y el 25% superiores a 2,2 µg/g.

Para terminar, es importante contrastar que, en nuestro estudio, entre las adolescentes mayores de 15 años, en edad fértil, con una mediana de 0.83 µg/g (0.48-1.43), un 40.8% de las mismas, presenta un valor superior al establecido por la EPA para el Hg en 1 µg/g y un 12.2 % un valor superior al establecido por la JECFA para el Hg en 2.2 µg/g.

Otro estudio, realizado parcialmente en el Japón y llevado a cabo por Murata K et al ¹⁹⁸ entre 2002 y 2003, contaba con la peculiaridad de intentar correlacionar poblaciones madre – niño, grandes consumidoras de pescado, tanto en el Japón como en las Islas Madeira. En él, se evaluó el THg encontrado en cabello de madres e hijos y curiosamente se observó que la población infantil japonesa presentaba unos valores inferiores a los encontrados en las Islas Madeira (Mediana 1.64 µg/g vs 4.09 µg/g). Estos datos concuerdan con el altísimo consumo de pescado de las islas atlánticas.

Obviamente, dado que Japón, como se ha citado anteriormente, es el mayor consumidor de pescado y especialmente de atún del mundo, es razonable que nuestros datos sean inferiores a los encontrados en los estudios realizados en el Japón.

Sin desplazarnos del continente asiático podemos evaluar dos investigaciones desarrolladas China. La primera, llevada a cabo por Liu Xiaojie et al.³⁴⁴ entre febrero de 2005 y junio de 2006, donde se estimaron las concentraciones de mercurio total en cabello de la población de la costa de China. Considerando las características geológicas del país se seleccionaron 5 ciudades: Dalian Lvshun, Shanghai, Ningbo, Zhoushan y Xiamen. Participaron 338 hombres con una edad media de 35,2 años (2-93) y 321 mujeres con una edad media de 39,1 años (1-90). La concentración de mercurio en cabello fue de GM: 0,83 µg/g, siendo superior en los hombres (0,94 µg/g) que en las mujeres (0,72 µg/g). El 43% del total de participantes tenían concentraciones de mercurio en el cabello superiores a 1 µg/g y el 13% superiores a 2 µg/g. Sin embargo, estos porcentajes fueron superiores en otras ciudades, ya que se observó una gran variabilidad en función de la ciudad de residencia. Los valores más elevados se encontraron en Zhoushan (2,44 µg/g en los hombres y 1,94 µg/g en las mujeres).

En el segundo estudio chino, realizado por Lei Zhang et al ³⁴³ en 2006, se eligió una población al noreste de China (Wujiazhan) para la evaluación de los niveles de THg en 108 muestras de cabello de residentes con una edad comprendida entre 5 y 73 años. La media geométrica total encontrada en esta población fue de GM: 0.648 µg/g (0.16-199), presentado una amplísima variabilidad en la misma. Sin embargo, en el grupo de edad de 1 a 15 años, la media geométrica encontrada fue de GM: 0.45 µg/g (0.18-2.24), observándose en este caso un margen mucho más estrecho de variabilidad. Por otro lado, no se han encontrado, al igual que ocurre en nuestro trabajo, diferencias respecto al sexo ni a la edad.

En la República de Korea, Kim S.A. et al ¹⁴⁸, en 2008 desarrollaron un estudio bajo los auspicios del Instituto Nacional para la enfermedad de Minamata de Japón. En el proyecto de investigación, incluido dentro del programa de promoción pública de la salud, se evaluaron 112 niños (72 niñas y 40 niños) y sus madres. Se encontraron una mediana en la población infantil de edad comprendida entre 1 y 6 años de M: 0.59 µg/g y RIC (0.46-0.89) µg/g. Asimismo, se observó un 17.5% de la población infantil con valores superiores a los límites establecidos por la EPA en 1 µg/g. Todos estos datos son inferiores a los encontrados en nuestro estudio lo que podría obedecer a un menor consumo de pescado entre su población infantil.

Desplazándonos a otro continente, es sobradamente conocido que en EEUU el consumo anual de pescado per cápita es muy bajo, siendo aproximadamente de 7 kg, valor éste muy inferior al encontrado en nuestro país, que en los últimos años se ha situado alrededor de los 36 kg.

Conociendo los efectos perjudiciales del metilmercurio sobre el desarrollo del sistema nervioso fetal e infantil, EE UU en su encuesta nacional para la evaluación de la salud y nutrición NHANES 1999-2000 ^{179,172} incluyó la selección de una muestra de 838 niños de 1 a 5 años en los que se determinó la concentración de mercurio en pelo. A todas las participantes se les administró un cuestionario que recogía la frecuencia de consumo de pescado en los últimos 30 días, además de rellenar un cuestionario sobre los alimentos consumidos en las últimas 24 horas. El consumo frecuente de pescado o marisco se asociaba con un incremento en la concentración de mercurio en pelo. En este sentido, el

42% no consumía nunca pescado, el 26% lo consumía 1-2 veces al mes y el 24% más de 3 veces al mes. La mediana de la concentración de mercurio en pelo fue de 0.11 µg/g, observándose como variaba ésta en función del consumo de pescado. Así, los consumidores de pescado de más de tres veces en los últimos 30 días prácticamente doblaban la concentración de los no consumidores (0.08 µg/g vs 0.14 µg/g).

Por otro lado, en este mismo estudio se realizó al mismo tiempo la evaluación a mujeres en edad fértil, objetivándose que únicamente el 7,8% (versus el 40.8% de nuestra investigación) tenían concentraciones de mercurio en sangre superiores a 5,8 µg/L, o lo que es equivalente a 1 µg/g de Hg en pelo, límite establecido por la EPA, dado el bajo consumo de pescado en la población a estudio, aun siendo el atún el pescado más consumido.^{179,172}

Merece la pena destacar en este estudio la variación establecida del ratio Hg en cabello-sangre. Este ratio había sido estimado por la OMS para el individuo adulto en 250:1²⁰³. Sin embargo, en este estudio y teniendo en cuenta el bajo consumo de pescado se consideró que dicho ratio para los niños debería ser modificado, siendo finalmente asignado el valor de 342:1¹⁷⁹.

En otro país, Canadá, en el estudio de Biomonitorización Humana se introdujo en 2007-2009, el grupo de edad 6 a 19 años. Los resultados preliminares correspondientes a 2678 participantes mostraron una media geométrica para el mercurio de 0,91 µg/L en el grupo de adultos y de 0,31 µg/L en el grupo de edades comprendidas entre 6 y 19 años. Menos del 1% de los canadienses entre 20 y 79 años tienen concentraciones de mercurio en sangre por encima del límite propuesto en Canadá de 20 µg/L.³³⁴ Por otro lado, es conocido que el consumo anual de pescado per cápita en Canadá es bajo, de aproximadamente 9 kg, muy similar al de EEUU y muy inferior al nuestro, lo que explicaría también los bajos niveles de mercurio en sangre encontrados. Finalmente, si aplicamos la fórmula propuesta por el NHANES para estimar la concentración de mercurio en cabello de población infantil a partir de la de la sangre ($[\text{Hg cabello}] = [\text{Hg sangre}] \times 342/1000$)¹⁷⁹ obtenemos en este estudio una media geométrica de concentración de mercurio en pelo de 0.11 µg/g. Dato éste, muy similar al de población infantil en EE.UU

En la Unión Europea, los países que consumen menos pescado son los del Centro y Este europeo donde el consumo per cápita de pescado es inferior a 15 kg por año y

consecuentemente, es donde se esperarían encontrar concentraciones más bajas de Hg en pelo. Los países del Noroeste de Europa consumen anualmente entre 15-30 kg/cápita por año y con un consumo anual superior a 30 kg/cápita se encontrarían los países del sur de Europa o Mediterráneos¹⁸⁹.

En Centroeuropa, concretamente en Alemania, en la Encuesta Ambiental Alemana (German Environmental Survey - GerES)^{27,262}, se determinó la concentración de mercurio en sangre. La media geométrica de la concentración de mercurio en sangre de población adulta fue de 0,46 µg/L en 1985/1986, de 0,51 µg/L en 1990/1992 y de 0,58 µg/L en 1997/1999. El único factor predictivo de la concentración de mercurio en sangre fue la frecuencia de consumo de pescado. En el GerES II, las personas que no consumían nunca pescado tenían una concentración de mercurio de 0,3 µg/L, aumentando a 0,8 µg/L en las que ingerían pescado más de una vez a la semana. En el GerES III la media geométrica de los que comían pescado más de una vez a la semana aumenta ligeramente a 0,91 µg/L. El percentil 95 era 2,1 µg/L en el GerES II y de 2,3 µg/L en el GerEs III.

El consumo anual per cápita de pescado era en 1999 de 12,6 kg, y en 2005 de 15 kg y representa aproximadamente el 40% del consumo anual español. Según los datos de la German Market Research Organization EMNID, aproximadamente el 70% de la población alemana consume pescado al menos una vez al mes. El 20% consume pescado una o varias veces a la semana y el 10% no consume nunca pescado. En cuanto a los pescados que consumen, las especies que dominan el mercado alemán son los arenques, el abadejo de Alaska, atún/bonito, salmón³¹¹...

De nuevo, en Alemania,²²¹ en un estudio realizado por Pesch A. et al en 2002. Se evaluó en un grupo de escolares (n: 245) de 8 a 10 años de edad la concentración de THg en cabello. La mediana obtenida fue de 0.22 µg/g y el percentil 90 encontrado fue de 0.4 µg/g. Valor éste, muy similar al percentil 90 establecido en el NHANES de 1999-2000.

En otro país centroeuropeo, Polonia, el consumo de pescado también es bastante moderado. En el año 2007, Jedrychowski W. et al publicaron los resultados de su estudio realizado en 313 mujeres embarazadas de entre 18 y 35 años en las que se determinó la concentración de mercurio en sangre. Se les administró un cuestionario que recopilaba información sobre características demográficas y de hábitos de vida, incluyendo el consumo

de pescado. La muestra de sangre se recogió en el parto. Se halló una mediana de concentración de mercurio en sangre en las madres de 0,6 µg/L. Asimismo, se halló una correlación positiva con el consumo de pescado. Los resultados coinciden en gran medida con los del GerES III cuya mediana era también de 0,6 µg/L. En este sentido, se confirma que muchos de los pescados que se consumen con más frecuencia en Polonia coinciden con los que se consumen en Alemania: arenques, caballa, abadejo de Alaska, merluza y salmón.

Curiosamente, en un país del norte de Europa, en Suecia, el consumo anual per cápita de pescado es de 28 kg, cifra más cercana a la nuestra de 36 kg. Sin embargo, los pescados más consumidos son el salmón, bacalao, arenque, langosta y langostinos que tienen un contenido de mercurio bajo, lo que explicaría que su mediana de concentración de mercurio en sangre sea inferior a lo esperado.³²⁵

En la zona Mediterránea, encontramos el estudio publicado por Sergi Díez et al⁶⁵ en 2007, en Italia, en el que colaboran el Instituto de Ciencias de la Tierra y el Departamento del Química Ambiental del CSIC de Barcelona con el Departamento de Preventiva de la Universidad de Nápoles “Federico II” en Italia, participaron 237 sujetos (115 hombres y 122 mujeres) con edades comprendidas entre los 35-45 años. Se halló una mediana de concentración de mercurio en cabello de 0,57 µg/g, siendo superior en los hombres (0,64 µg/g) que en las mujeres (0,51 µg/g). En los hombres se observó un valor máximo de 3,4 µg/g y en las mujeres de 1,53 µg/g. Llama la atención que, al contrario de lo que sucede en otros estudios, aquí se ha visto que a medida que aumentaba la edad de los participantes la concentración de mercurio en sangre disminuía. Asimismo, coincidiendo con el resto de estudios se observó un aumento de la concentración de mercurio en pelo a medida que aumentaba el consumo de pescado. En este estudio, el 94% de los participantes se encontraban por debajo de la RfD para cabello de 1 µg/g, presentando únicamente 4 sujetos (1,3%) concentraciones de mercurio por encima de 2 µg/g. En Italia, el consumo anual per cápita de pescado es de 24 kg ³¹¹, más bajo de lo que cabría esperar al ser un país mediterráneo, representando el 66% de nuestro consumo anual. Aproximadamente la mitad de los sujetos participantes (41%) no habían comido nada de pescado en los últimos 6 meses, lo que explicaría esta cifra. Además, el tipo de pescado consumido varía mucho dependiendo de la zona.

Por otro lado, en Grecia, donde el consumo anual per cápita es similar al italiano ³¹¹, se realizó un estudio en un grupo de islas en el mar Egeo con una población aproximada de 200.000 personas y consumo de pescado elevado (Gibicar et al en 2006). Participaron 246 mujeres residentes de las islas con una media de edad de 29 años (17-46). La población se dividió en cinco grupos de islas: Lesvos, el grupo Chios, Samos, el grupo Ikaria y el grupo Leros. Tanto la media de edad como el nivel de estudios era comparable en los cinco grupos. La media geométrica de la concentración de mercurio en cabello fue de 1,36 µg/g, observándose un valor mínimo de 0,046 y un valor máximo de 17,5 µg/g. Aproximadamente el 5% de las mujeres tenían concentraciones de mercurio en cabello superiores a 6,0 µg/g. Al investigar sus hábitos dietéticos se halló que una tercera parte comía pescado 3 veces o más veces por semana, un tercio una vez a la semana y el 10% no consumían pescado o lo hacían ocasionalmente. Se observó un aumento de la concentración de mercurio en pelo a medida que aumentaba el consumo de pescado. Aunque el consumo anual per cápita es muy similar al de Italia, e incluso inferior al de Suecia, el tipo de pescado consumido, procedente del mar Egeo, probablemente sea la causa de que se observen estas concentraciones de mercurio más elevadas.

Finalmente, en una población costera de Marruecos se llevó a cabo el estudio de Elhamri H. et al en 2007. Así, en una población de n: 108 (68 hombres y 40 mujeres) se evaluó la concentración de THg y MeHg en pelo. En el grupo de edad de 10 a 19 años se encontró una media geométrica de THg de 0.6 µg/g, mientras que la mediana del THg de esta población fue de M: 1.46 µg/g y un RIC (0.93-5.03) µg/g.

Curiosamente, se observó que la GM de THg en aquellos sujetos que no consumían pescado era de 0.29 µg/g, dato éste que se encuentra en concordancia con los de otros estudios (Lindberg et al. 2004). Por otro lado, es necesario significar que aproximadamente un 50% de las mujeres en edad fértil presentaban niveles por encima de el límite establecido por JECFA de 2.2 µg/g lo que supondría un porcentaje mucho mayor de mujeres por encima del límite establecido por EPA de 1 µg/g.

Como punto final, introduciremos el estudio realizado por Marqués R¹⁷⁵ et al en 2007, en la cuenca del Amazonas, zona aurífera por excelencia en la que se supone que han sido liberadas grandes cantidades de Hg al medio ambiente. Esta investigación se desarrolló de

forma longitudinal obteniéndose muestras de cabello de las madres, los recién nacidos, a los 6 meses, 36 meses y 60 meses. Es conocido que en los recién nacidos el THg representa la exposición fetal y a los 6 meses el origen suele ser materno, fundamentalmente en aquellos bebés que toman lactancia natural. Los valores encontrados fueron 3.8 µg/g a los 6 meses, 2.6 µg/g a los 30 y, de nuevo, 2.6 µg/g a los 60 meses. Asimismo, se evaluó la presencia de Hg en función del consumo de pescado y se objetivó que el aumento del consumo originaba un incremento en la concentración del Hg. La peculiaridad de este estudio radica en la evaluación que se hizo, en diferentes periodos de tiempo, de la posible alteración en el desarrollo cognitivo de los niños tras exposición al Hg. En este sentido, fue estimado que el aumento en 1 µg/g de MeHg en pelo de la madre podría disminuir hasta en 0.7 puntos el CI de los niños.

5.3 Consideraciones finales

La peculiaridad de nuestro estudio, y en ello radica su importancia, es la determinación de un número elevado de elementos traza en muestras de cabello de población infantil partiendo de un gran tamaño muestral muy superior a los habitualmente disponibles y utilizados en estudios de este tipo, que hace que, junto a poder realizar estimaciones con un muy alto grado de fiabilidad, haya permitido la realización de numerosas intercomparaciones que de otro modo, dada la escasez de las muestras, no habrían tenido significación alguna

El procedimiento de encuesta empleado ha proporcionado unos porcentajes de respuesta muy elevados. Sin embargo, no deja de presentar ciertas limitaciones puesto que se pueden haber producido sesgos de memoria. Por un lado, debido a que los datos de consumo de pescado se recogen retrospectivamente mediante un cuestionario cuantitativo de frecuencia de consumo y por otro, dado que, como se considera que el consumo de pescado

es bueno y saludable, es previsible que los individuos encuestados, fundamentalmente los padres, contesten que sus hijos consumen más pescado de lo que lo hacen en realidad.

Se ha elegido el cabello como matriz por las innumerables ventajas que presenta, dado que es una muestra que para su obtención no requiere de técnicas invasivas ni dolorosas y se trata de un espécimen física y químicamente estable y fácilmente almacenable. Esto la convierte en una muestra especialmente atractiva para la población pediátrica, según datos derivados del NHANES¹⁷⁹. Asimismo, es considerado el biomarcador más adecuado para evaluar la exposición al Hg en prolongados periodos de tiempo (NRC-2000)²⁰³.

Todo ello, hace de él un adecuado biomarcador para estimar la entrada, exposición y status de elementos traza, así como un adecuado indicador del nivel de exposición en periodos prolongados de tiempo, incluso del período fetal.

Como resumen, en referencia a los elementos analizados, es importante significar que el Be se encontraba en todas las muestras por debajo del LD (0.032). El Pb, Cd y Al se manifestaban mas elevados en el grupo de 0 a 5 años y posteriormente iban disminuyendo. En ambas afirmaciones, estos hechos concuerdan con la bibliografía consultada. Finalmente y como contraste con lo que sucede en la mayoría de los países de nuestro entorno, el elemento esencial Cu presenta en este estudio unos valores superiores a los descritos en la bibliografía mientras que en el caso del Zn ocurre lo contrario, manifestando éste unos valores inferiores a los mostrados en la literatura científica

Por último, merece la pena destacar la importancia de establecer unos valores de referencia de elementos traza tanto a nivel infantil como juvenil a fin de evidenciar cualquier pequeña alteración en el desarrollo junto con deficiencias de elementos nutricionales e influencia de elementos tóxicos. De este modo, tendríamos la base adecuada para poder interpretar futuros estudios de biomonitorización como los realizados en Alemania²⁷, República Checa²⁸, Canadá³³⁴, Estados Unidos²⁰⁵, Korea²¹⁴...

En referencia al Mercurio

La EPA considera que medir la concentración de THg resulta una adecuada estimación del metilmercurio¹⁷². No obstante, esta apreciación supone cierta limitación en el estudio, dado que las estimaciones del MeHg pueden oscilar entre un 80% y un 95% del THg^{43,44,67} y, asimismo, no existe confirmación de que esta proporción sea estable en los diferentes especímenes y en las distintas áreas geográficas del planeta.

A su vez, recientemente, diferentes estudios epidemiológicos prospectivos en las islas Feroe y Nueva Zelanda han confirmado que la exposición, incluso a niveles bajos de metilmercurio, origina también alteraciones en el sistema nervioso que afectan a los procesos del desarrollo feto/infantil (memoria, atención, aprendizaje...) ^{117,118,129,131,199}

Numerosos estudios adicionales de exposición dietética en humanos realizados en diferentes comunidades: Canadá, Madeira (Portugal), Amazonia (Brasil), Nuevo Méjico, Perú, Japón, Camboya, Suecia..., han evidenciado efectos adversos en el desarrollo neurológico de los niños a bajas dosis de MeHg^{16,32,137,197,198,287,288}.

Incluso, en España ya existen datos que ponen de manifiesto la neurotoxicidad del mercurio en niños. En el proyecto INMA, en los resultados de la cohorte de niños de 4 años de Granada¹⁰⁴ se mostraba una media geométrica de mercurio en cabello de 0,96 µg/g y, asimismo, el incremento de 1 µg/g de mercurio en cabello se asociaba con un descenso de 6,6 puntos en la evaluación cognitiva, de 8,4 puntos en el área de la memoria y de 7,5 puntos en el área verbal (MSCA: The McCarthy Scales of Children's Abilities). Es decir, un aumento en la concentración de mercurio se asociaba a un retraso en el desarrollo cognitivo.

Pese a la coincidencia generalizada sobre su influencia, existe igualmente gran controversia respecto a los umbrales de seguridad. Así, la EPA establece su límite en una concentración de mercurio en sangre de 5,8 µg/L, que equivale a una concentración de Hg en pelo de 1 µg/g. Frente a ello, *La National Academy Science NAS*³⁰² en Estados Unidos establece que un valor de Hg en sangre de 3,5 - 4 µg/L en mujeres embarazadas puede producir efectos adversos en el feto.

Citar también, el estudio realizado por Marqués R et al¹⁷⁵ en 2007, en la cuenca del Amazonas, en el que se estimó que el aumento en 1 µg/g de MeHg en pelo de la futura madre podría disminuir hasta en 0,7 puntos el CI de los niños. Este estudio fue avalado por el Harvard Center of Risk Analysis. Asimismo, en el estudio mencionado anteriormente desarrollado en España por Freire et al¹⁰⁴ los resultados encontrados fueron similares a los hallados en la investigación llevada a cabo en la cuenca del Amazonas.

Por último, en Alemania gracias a los estudios de biomonitorización realizados durante años se ha establecido que a aquellas mujeres embarazadas con niveles de Hg en pelo superiores a 1,5 µg/g se les debe valorar el consumo de pescado.^{27,262}

Paralelamente a estas aseveraciones en el caso del Hg, se ha visto como se ha ido disminuyendo el nivel de seguridad para el Pb en sangre establecido por el CDC en estos últimos años (última disminución del nivel de Pb en sangre a 5 µg/dL en Junio de 2012), dado que se confirma en gran número de elementos tóxicos que no se puede estimar un umbral seguro en grupos vulnerables como es la población infantil

Asimismo, se manifiesta una amplia coincidencia de la comunidad científica sobre que la concentración de mercurio depende principalmente del consumo de pescado. En esa misma línea se muestran los resultados obtenidos en nuestro estudio, que presentan una correlación significativa ($p < 0,001$), claramente positiva entre la concentración de Hg en pelo y el consumo de pescado

Mención especial merece el porcentaje de niños/adolescentes de nuestro estudio que excede el límite de seguridad establecido por la EPA en 1 µg/g que equivale a prácticamente el 50% de la población infantil y por otro lado, el porcentaje de niños/adolescentes que excede el límite de seguridad establecido por la JECFA en 2,2 µg/g, que representa un 17% de dicha población

Enlazando con lo descrito anteriormente y como punto final a estas consideraciones, se ha de remarcar que entre las adolescentes en edad fértil, mayores de 15 años, con una mediana de 0,83 µg/g y RIC (0,48-1,43) µg/g. Un 40,8% de las mismas presenta un valor

superior al establecido por la EPA para el Hg en pelo en 1 µg/g que equivaldría a 5,8 µg/L en sangre y un 12,2 % un valor superior al establecido por la JECFA para el Hg en 2,2 µg/g. Siendo, asimismo, en este grupo de edad el valor máximo de Hg encontrado de 4,52 µg/g.

Conclusiones

6. Conclusiones

Como resultados principales del trabajo de investigación desarrollado, se presentan los siguientes:

1. Se han establecido los Valores de Referencia de los 19 elementos traza seleccionados en muestras de cabello para la población infantil y juvenil (estos resultados se muestran en el anexo IV).

El cabello se ha acreditado como una muestra útil y fiable, para este tipo de determinaciones, lo que unido a sus ya conocidas características de fácil obtención y conservación, etc, hacen que resulte ampliamente válida para este fin.

2. Se ha evidenciado que los estudios similares llevados a cabo en poblaciones de otros países, que no consumen pescado o bien lo consumen con muy escasa frecuencia, presentan valores de Hg en pelo inferiores a 0,5 µg/g.

Por el contrario, como se significa en este estudio, en España se manifiestan unos valores de Hg en pelo claramente superiores^{194,261}, así:

- Niños de 0 a 5 años, mediana: 0,90 µg/g
- Niños de 6 a 10 años, mediana: 1,02 µg/g
- Niños de 11 a 15 años, mediana: 0,98 µg/g
- Niños mayores de 15 años, mediana: 0,86 µg/g

3. Se ha constatado la amplia superación, gracias a los porcentajes significativos de la población infantil, de los umbrales de seguridad establecidos internacionalmente, así:

- Un 17% (213.350) de la población infantil de la Comunidad de Madrid, excede los límites de seguridad recomendados por la JECFA (FAO/OMS) en 2,2 µg/g.
- Un 48% (602.400 menores de 18 años) supera los límites de seguridad para el Hg, establecidos por la US EPA en 1 µg/g.

Asimismo, entre las adolescentes en edad fértil, mayores de 15 años, con una mediana de 0,83 µg/g y RIC (0,48-1,43) µg/g.

- Un 40,8 % de las mismas presenta un valor superior al establecido por la EPA para el Hg en pelo en 1 µg/g que equivaldría a 5,8 µg/L en sangre.
 - Un 12,2 % un valor superior al establecido por la JECFA para el Hg en 2,2 µg/g.
 - Siendo, asimismo, en este grupo de edad el valor máximo de Hg encontrado de 4,52 µg/g.
4. Se ha constatado una correlación significativa ($p < 0,001$), claramente positiva entre la concentración de Hg en pelo y el consumo de pescado.

Frente a las evidencias de la contaminación de Hg a través de ese vector, se ha estimado como factor de protección respecto a la concentración de Hg en pelo, el consumo de pescado en un número menor de 3 veces por semana. Con ello el riesgo de tener una concentración de Hg en pelo superior a 1 µg/g se reduce en un 35% y en un 8,9% el de tener una concentración mayor de 2,2 µg/g.

Bibliografía

7. Bibliografía.

1. A. Khalique, S, Ahmad T, Jaffar AM, Shah MH, Shaheen N, Saadia R, and Manzoor S. A comparative study based on gender and age dependence of selected metals in scalp hair. *Environmental Monitoring and Assessment* 2005;104:45-57.
2. Adams JB, Holloway CE, George F, Quig D. Analyses of Toxic Metals and Essential Minerals in the Hair of Arizona Children with Autism and Associated Conditions, and Their Mothers. *Biological Trace Elem Res* 2006;110:193.
3. Adams JB, Romdalvik J, Sadagopa VM, Marvin S. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part. A: current issues: Mercury, Lead and Zinc in Baby Teeth of Children with Autism versus Controls.* 2007;70:12,1046-1051.
4. Agencia española de Seguridad Alimentaria (AESA). Nota informativa de la AESA (17-06-04) sobre mercurio y metil mercurio en productos pesqueros. Ministerio de Sanidad y Consumo España .AESA, Madrid 17 junio 2004.
5. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).- Programa de Medio Ambiente de las Naciones Unidas. [Web cadena alimentaria/subdetalle/oms_mercurio2008](#)
6. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).- Recomendaciones de consumo de pescado (pez espada, tiburón, atún rojo y lucio) debido a la presencia de mercurio. [Web/rincon consumidor/subsección/mercurio_pescado.2009](#)
7. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).- Recomendaciones de consumo de pescado para poblaciones sensibles debido a la presencia de mercurio.2011
8. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Mercury. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, ATSDR, Atlanta, GA 1999. Disponible en URL: www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.html
9. Agusa T, Kunito T, Iwata H, Monirith I, Seang T, Subramanian A, Tanabe S. Mercury contamination in human hair and fish from Cambodia: levels, specific accumulation and risk assessment. *Environmental Pollution* 2005;134:79-86.
10. Ahsan H, Chen Y, Parvez F, Zablotska L, Argos M, Hussain I, Momotaj H, Levy D, Cheng Z, Slavkovich V, Van A, Howe G, Graziano J. Arsenic Exposure from Drinking Water and Risk of Premalignant Skin Lesions in Bangladesh: Baseline Results from the Health Effects of Arsenic. Longitudinal Study. *American Journal of Epidemiology* 2006;163 No.12
11. akir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Khalidi A, Al-Rawi NY, Tikriti S, et al. Methylmercury Poisoning in Iraq. *Science* 1973;181:230-41.

12. Al-Mufti A, Copplestone J, Kazanitzis G. Epidemiology of organomercury poisoning in Iraq: I. Incidence in a defined area and relationship to the eating of contaminated bread. *Bull World Health Organ* 1976;53 (suppl):23-36.
13. AMAP/UNEP. Technical Background Report to the Global Atmospheric Mercury Assessment. Arctic Monitoring and Assessment Programme/UNEP Chemicals Branch 2008. Disponible en URL: http://www.chem.unep.ch/mercury/Atmospheric_Emissions/Technical_background_report.pdf
14. Angley M, Young R, Ellis D, Chan W, Mckinnon R. Children and autism. Part 1- recognition and pharmacological management. *Aust Fam Physician* 2007;36(9):741-4.
15. Appendix B: Important Issues Regarding Mercury. *Pediatric Environmental Health*.1996.
16. Archivo de "EL PAÍS". El Gobierno oculto siete años un estudio de los tóxicos en el pescado. Dictamen confidencial del Instituto Español de Oceanografía (IEO) de 2003.
17. Arnold LE, Pinkham SM, Votolato N. Does zinc moderate essential fatty acid and amphetamine treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder?. *Child adolesc Psychopharmacol*.2000;10(2):111-7.
18. Arti Freire C. Hair trace levels children. www.sciencedirect.com Spain. Granada 2010.
19. Artic of Environment Chemicals Mercury 2010. <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/mercury>
20. ATSDR (U.S.Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for mercury: A National review of exposure events: 2009
21. Bakir F, Rustam H, Tikriti S, Al-Damluji SF, Shiristani H. Clinical and epidemiological aspects of methylmercury poisoning. *Postgrad Med J* 1980;56:1-10.
22. Bao QS, Lu CY, Song H, Wang M, Ling W, Chen WQ, Deng XQ, Hao YT and Rao S. Behavioural development of school-aged children who live around a multi-metal sulphide mine in Guangdong province, China: across-sectional study. *BMC Public Health* 2009;9:217.
23. Barbieri FL, Cournil A, Souza JE, Bénéfice E, Gardon J. Hair Trace Elements Concentration to Describe Polimetallc Mining Waste Exposure in Bolivian Altiplano. *Boil trace Elem Res*.2011;139:10-23.
24. Barlow PJ, Sylvester PE, and Dickerson JWT. Hair trace metal levels in down syndrome patients. *J. ment. Defic.Res*.1981;25:161.
25. Bazzi A, Nriagu J, and Linder A. Determination of toxic and essential elements in children's blood with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Environ. Monit.* 2008;10:1226-1232.
26. Beaty RD, Kerber JD. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrometry Ed. Perkin Elmer Corporation, Norwalk, USA, 1993.
27. Becker K, Kaus S, Krause Ch, Lepom P, Schulz Ch, Seiwert M, Seifert B. German Environmental Survey 1998 (GerES III): environmental pollutants in blood of the German population. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2002;205:297-308.

-
28. Benes B, Sladka J, Spevackova V, Smid J. Determination of normal concentration levels of Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Se and Zn in Hair of the child population in the Czech Republic. 2003, pg.84
 29. Benton D. Micro-nutrient supplementation and the intelligence of children. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2001;25:297-309.
 30. Berglund M, Lind B, Ask Björnberg K, Palm B, Einarsson Ö, and Vahter M. Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. *Env Health: A Global Access Science source* 2005;4:20.
 31. Bernard S, Enayati A, Redwood L, Roger H, Binstock T. Autism: a novel form of mercury poisoning. *Medical Hypotheses* 2001;56(4):462-471.
 32. Björnberg K A, Vahter M, Grawe k.P, Berglund M. 2005. Methyl mercury exposure in Swedish women with high fish consumption. *Sci Total environ* 341:45-52
 33. Boffeta P, Sallsten G, Garcia-Gomez M, Pompe-Kim V, Zaridze D, Bulbulyan M, et al. Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. *Occupational and Environmental Medicine* 2001;58:461-6.
 34. Boss CB, Fredeen KJ. Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. The Perkin-Elmer Corporation 1997
 35. Bouchard M, Laforest F, Vandelac L, Bellinger D, Mergler D. Hair Manganese and Hyperactive Behaviors: Pilot Study of School-Age Children Exposed through Tap Water. *Environ Health Perspect* 2007;115(1):122-127.
 36. Braun J, Kahn R, Froehlich T, Auinger P, Lanphear B. Exposures to Environmental Toxicants and Attention Deficit Hyperactivity Disorder in US Children. *Environmental Health Perspectives*. ProQuest Health and Medical Complete 2006;114.12 pg.1904
 37. Brian G, Mizon K, Taylor A, Korsch M, Stauber J, Davis JM, Louie H, Wu M, Swan H. Changes in manganese and lead in the environment and young children associated with the introduction of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl in gasoline-preliminary results. *Elsevier* 2005;100:100-114.
 38. Calderon J, Navarro ME, Jimenez-Capdeville ME, Santos-Diaz MA, Golden A, Rodriguez-Leyva I, Borja-Aburto V, Diaz-Barriga F. Exposure to Arsenic and Lead and Neuropsychological Development in Mexican Children. *Elsevier* 2001
 39. Carta P, Flore C, Alinovi AI, Toccol M.G., Arul G, Carta R, et al. Sub- Clinical Neurobehavioral Abnormalities Associated with Low Level of Mercury Exposure through Fish Consumption. *Neurotoxicology* 2003;24:617-23.
 40. Castoldi AF, Johansson C, Onishchenko N, Coccini T, Roda E, Vahter M, et al. Human developmental neurotoxicity of methylmercury: impact of variables and risk modifiers. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008;51(2):201-14.
-

41. Castro-Gonzalez MI, Armenta M. Heavy-metals: Implications associated to fish consumption. Elsevier B.V. 2008;26:263-271.
42. Cavan K, Gibson R, Grazioso C, Isalgue AM, Ruz M, and Solomons NW. Growth and body composition of periurban Guatemalan children in relation to zinc status: a longitudinal zinc intervention trial. *Am J. Clin.Nutr.*1993;57:344-52.
43. Cernichiari E, Brewer R, Myers GJ, Marsh DO, Laphan LW, Cox C. Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. *Neurotoxicology* 1995;16: 705-710
44. Cernichiari E, Myers GJ, Ballatori N, Zareba G, Vyas J, Clarkson T. The biological monitoring of prenatal exposure to methylmercury. *NeuroToxicology* 2007; 28:1015-1022.
45. Chan HM, Egeland GM. Fish Consumption, Mercury Exposure, and Heart Diseases. *Nutrition Reviews* 2004;62(2):68-72.
46. Chan S, Gerson B, Reitz RE, Sadjadi SA. Technical and clinical aspects of spectrometric analysis of trace elements in clinical samples. *Clinics in Laboratory Medicine* 18(4):615-629 (1998).
47. Chang J.W., Pai MC, Chen HL, Guo HR, Su HJ, Lee CC. Cognitive function and blood methylmercury in adults living near a deserted chloralkali factory. *Environ Res* 2008;108:334-9.
48. Chapman L, Chan HM. The influence of nutrition on methylmercury intoxication. *Environ Health Perspect* 2000;108(1):29-56.
49. Chen G, Jackson KW. *Spectrochim Acta Part B* 53B:981-991 (1998)
50. Chevrier C, Sullivan K, White R, Comtois C, Cordier S, Grandjean P. Qualitative assessment of visuospatial errors in mercury-exposed Amazonian Children. *NeuroToxicology* 2009;30:37-46
51. Choi AL, Cordier S, Weihe P, Grandjean P. Negative confounding in the evaluation of toxicity: the case of methylmercury in fish and seafood. *Crit Rev Toxicol* 2008;38(10):877-93.
52. Chojnacka K, Górecka H, Górecki H. The effect of age, sex, smoking habit and hair color on the composition of hair. *Env. Toxic. and Pharmacology* 2006;22:52-57.
53. Clarkson TW, Vyas JB, Ballatori N. Mechanisms of Mercury Disposition in the Body. *Am J Ind Med* 2007;50:757-64.
54. Clarkson TW. The toxicology of mercury. *Crit. Rev. Clin Lab Sci* 1997;34:369-403
55. Cocho JA. Espectroscopía de absorción atómica. Optimización de condiciones instrumentales y analíticas en cámara de grafito y generación de hidruros. En: Fundación MAPFRE Medicina. Metales pesados tóxicos: Normativa actual y técnicas de análisis. Ed. MAPFRE 1996. pp 81-110
56. Cocho JA. Análisis de elementos traza. En: Análisis de Elementos traza: aspectos bioquímicos, analíticos y clínicos. Cocho JA, Escanero JF, González de Buitrago JM. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular 1998. Pp 113-141.

-
57. Cohen J, Bellinger D, Shaywitz BA. A Quantitative analysis of Prenatal Methyl Mercury Exposure and Cognitive Development. *Am J Prev Med* 2005;29(4):353
 58. Collipp PJ, Chen SY, Maitinsky S. Manganese in Infant Formulas and Learning Disability. *Ann.Nutr.Metab.* 1983;27:488-494.
 59. Counter SA, Buchanan LH. Mercury exposure in children: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;198:209-30.
 60. Davidson P, Strain JJ, Myers G, Thurston S, Bonham M, Shamlaye C, Stokes-Riner A, Wallace J, Robson P, Duffy E, Gerogger L, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Canfield R, Cox Ch, Shan L, Janciuras J, Clarkson T. Neurodevelopmental effects of naternal nutritional status and exposure to methylmercury from eating fish during pregnancy. *NeuroToxicology* 2008;29:767-775.
 61. Debes F, Budtz-Jorgensen E, Weihe P, White RF, Grandjean P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicol Teratol* 2006;28(5):536-47.
 62. Del Castillo B. Espectroscopía de emisión de plasma En: Valls O, Del Castillo B. Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud. Ed. Piro (1998)
 63. Deth R, Muratore Ch, Benzecry J, Power-Charnitsky VA, Waly M. How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox / methylation hypothesis. *NeuroToxicology* 2008;29:190-201.
 64. Díez S, Delgado S, Aguilera I, Astray J, Pérez-Gómez B, Torrent M, Sunyer J, Bayona JM. Prenatal and Early Childhood Exposure to Mercury and Methylmercury in Spain, a High-Fish-Consumer Country. *Arch Environ Contam Toxicol* 2009;56:615-622.
 65. Díez S, Montuori P, Pagano A, Samacchiaro P, Bayona JM, Triassi M. Hair mercury levels in an urban population from southern Italy: Fish consumption as a determinant of exposure. *Environment Int.* 2008;34:162-167.
 66. Díez S,. Human Health Effects of Methylmercury Exposure. *Rev.of Environm.Contamination and Toxicology* 2008; vol 198, pg.111.
 67. Dolbec J, Mergler D, Larribe F, Roulet M, lebel J, Lucotte M. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. *The Science of the Total Env.* 2001;271:87-97.
 68. Donaldson SG, Van J, Tikhonov C, Feeley M, Armstrong B, Ayotte P, Boucher O, Bowers W, Chan L, Dallaire f, Dallaire R, Dewailly E, Edwards J, Egeland GM, Fontaine J, Furgal C, Leech T, Loring E, Muckle G, Nancarrow T, Pereg D, Plusquellec P, Potyrala M, Receveur O, Shearer RG. Environmental contaminants and human health in the Canadian Arctic. *Science of the total Env* 2010;408:5165-5234.
 69. Dongarra G, Lombardo M, Tamburo E, Varrica D, Cibella F, Cuttitta G. Concentration and reference interval of trace elements in human hair from students livin in Palermo, Sicily (Italy). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2011;32:27-34.
 70. Dongarra G, Varrica D, Tamburo E, D'Andrea D. Trace elements in scalp hair of children living in differing environmental contexts in Sicily (Italy). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2011;34:160-169.
-

-
71. Druyan M, Bass D, Puchyr R, Urek K, Quig D, Harmon E, Marquardt W. Determination of Reference Ranges for Elements in Human Scalp Hair. *Biol Trace Elem Res.*, 1998, vol 62, pág. 183.
 72. Duniez-Sokolowska A, Radomska K, Dlugaszek M, Graezyk A. Contents of bioelements and toxic metals in the Polish population determined by hair analysis. Part 1. Children aged 1 to 10 years. *Magnes Res.* 2006;19(1):35-45.
 73. Duniez-Sokolowska A, Radomska K, Dlugaszek M, Graezyk A. Contents of bioelements and toxic metals in the Polish population determined by hair analysis. Part 2. Young persons aged 10-20 years. *Magnes Res.* 2006;19(3):167-179.
 74. EFSA. Press Releases & News Stories 2004. EFSA provides risk assessment on mercury in fish: precautionary advice given to vulnerable groups.
 75. Efskind J, Ellingsen DG, Hartman A, Thomassen Y, Ulvik RJ, Gaarder PI, et al. Renal function of chloralkali workers after the cessation of exposure to mercury vapor. *Scand J Work Environ Health* 2006;32:241-9.
 76. El P, Liu DH, Zhang GQ. Efectos de alto nivel de manganeso en las aguas residuales de riego niños neurobehavior. *Fang Yu Zhonghua Yi Xue Za* 1994;28(4):216-8.
 77. Ellingsen DG, Efskind J, Haug E, Thomassen Y, Martinsen I, Gaarder PI. Effects of low mercury vapour exposure on the thyroid function in chloralkali workers. *J Appl Toxicol* 2000;20(6):483-9.
 78. Ellingsen DG, Bast-Pettersen R, Efskind J, Thomassen Y. Neuropsychological effects of low mercury vapor exposure in chloralkali workers. *Neurotoxicology* 2001;22:249-58.
 79. Endo T, Haraguchi K. High Mercury levels in hair samples from residents of Taiji, a Japanese whaling town. *Marine Pollution Bulletin* 2009.11.020.
 80. EPA de los EE.UU. La exposición humana: mercurio. 2010. www.epa.gov/mercury/exposure.htm
 81. Esteban E, Rubin CH, Jones RL, Noonan G. Hair and Blood as Substrates for Screening Children for Lead Poisoning. *Archives of Environmental Health: An Int J* 1999;pág 436.
 82. European Commission. Regulation (EC) No 1102/2008 of the European Parliament and of the Council of 22 October 2008 on the banning of exports of metallic mercury and certain mercury compounds and mixtures and the safe storage of metallic mercury. *Official Journal L* 2008;304:75-9.
 83. European Commission Directorate General Environment. Mercury. European Commission DG Env; 2009
 84. European Commission Directorate General Environment. Methyl mercury in fish and fishery products; 2008
 85. European Commission, Directorate-General Environment. Options for reducing mercury use in products and applications and the fate of mercury already circulating in society. Final Report 2008. Disponible en URL: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/mercury/pdf/study_report2008.pdf
-

-
86. European Commission, Directorate-General health and Consumer Protection. Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States. Reports on task for scientific cooperation SCOOP 3 2 11 2004.
 87. European Commission. Commission Decision of 19 May 1993 determining analysis methods, sampling plans and maximum limits for mercury in fishery products. Official Journal L 1993;144:23-4.
 88. European Commission. Commission Regulation N°629/2008 of 2 July 2008 amending Regulation N° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal L 2008; 173:6-9.
 89. European Commission. Council Directive 96/61/EC of 24 September 1996 concerning integrated pollution prevention and control. Official Journal L 1996;257:26-40.
 90. European Commission. Directive 2006/66/EC of the European Parliament and of the Council of 6 September 2006 on batteries and accumulators and waste batteries and accumulators and repealing Directive 91/157/EEC . Official Journal L 2006;266:1-14.
 91. European Commission. Directive 2008/103/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 amending Directive 2006/66/EC on batteries and accumulators and waste batteries and accumulators as regards placing batteries and accumulators on the market. Official Journal L 2008;327:7-8.
 92. European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food. The EFSA Journal 2004;34:1-14.
 93. FAO. 2011. Informe del 29.º período de sesiones del Comité de Pesca. Informe de Pesca y Acuicultura n.º 973. FAO. Roma.
 94. Faraone S, Khan S. Candidate Gene Studies of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. J Clin Psychiatry 2006;67 (suppl 8):13-20
 95. Feng P, Qiu G, Shang Z. Mercury pollution in Asia: A review of the contaminated sites. Journal of Hazardous Materials 2009;168:591-601.
 96. Ferré-Huguet N, Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. Monitoring Metals in Blood and Hair of the Population Living Near a Hazardous Waste Incinerator: Temporal Trend. Biol. Trace Elem. Res. 2009; 128:191-199.
 97. Fido A, Al-Saad S,. Toxic trace elements in the hair of children with autism. www.sagepublications.com Autism 2005. SAGE Publications and The Matopmañ Autistic Society. Vol.9(3):290-298.
 98. Fido A, Dashti H, Al-Saad S. Biological correlatos of childhood autism: “trace elements”. Trace Elements and Electrolytes 2002;vol.19.no.4:205-208.
 99. Filipek PA, Accardo PJ, Ashwal S, Baranek GT, Cook EH, Dawson G, Gordon B, Gravel JS, Johnson CP, Kallen RJ, Levy SE, Minshew NJ, Ozonoff S, Prizant BM, Rapin I, Rogers SJ, Stone WL, Teplin SW, Tuchman RF and Wolkmar FR. Practice parameter: screening and diagnosis of autism. Neurology 2000;55:468-479.
-

-
100. Fillion M, Mergler D, Sousa Passos CJ, Larribe F, Lemire M, Guimaraes JR. A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. *Environ Health* 2006;29(5).
 101. Foo, SC, Khoo NY, Heng A, Chua LH, Chia SE, Ong CN, Ngim CH, and Jeyaratnam J. Metals in hair as biological indices for exposure. *Int. Arch Occup Env. Health* 1993;65:583-586.
 102. Foro Intergubernamental sobre Seguridad Química-5ª Reunión. IFCS/Forum V 04-TS. Efectos Colaterales no deseados de los productos químicos. Forum V (25 al 29 sept. 2006).
 103. Forte G, Alimonti A, Violante N, Sancesario G, Brusa L, Bocca B. Metals imbalance in hair of patients affected by Parkinson's disease. *Trace Elements and Electrolytes*. 2007;vol.24-No 4/2007:202-210
 104. Freire C, Ramos R, Lopez-Espinosa MJ, Díez S, Vioque J, Ballester F, Fernández MF. Hair mercury levels, fish consumption and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Elsevier. Environmental Res.* 2010;110:96-104.
 105. Froehlich T, Bruce P, Epstein J, Barbaei W, Katasic S, Kaha R. Prevalence, Recognition, and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in a National Sample of US Children. *American Medical Association. Arch Pediatr Adolesc Med* 2007;161(9):857-861
 106. Gao Y, Yan CH, Tian Y, Wang Y, Xie HF, Zhou X, Yu XD, Yu XG, Tong S, Zhou QX, Shen XM. Prenatal exposure to mercury and neurobehavioral development of neonates in Zhoushan City, China. *Environ res* 2007;105(3):390-9.
 107. Geier D, Kern J, Garver C, Adams JB, Audhya T, Nataf R, Geier MR. Biomarkers of environmental toxicity and susceptibility in autism. *J. of the neurological Sciences* 2009;280:101-108.
 108. Gellein K, Lierhagen S, Steinar P, Teigen M, Kaur P, Singh T, Peder T, Syversen T. Trace Element Profiles in Single Strands of Human Hair Determined by HR-ICP-MS. *Biol Trace Elem Res* 2008;123:250-260.
 109. Gerstenberger SL, Tavis D, Hansen L, Pratt-Shelley J, Dellinger JA. Concentrations of Blood and Hair Mercury and Serum PCBs in an Ojibwa Population That Consumes Great Lakes Region Fish. *Clin Toxicology* 1997;35(4):377-386.
 110. Gibson R, Skeaff M, Willians S. Interrelationship of Indices of Body Composition and Zinc Status in 11-Yr-Old. *New Zealand Children. Biol.Trace Elem.Res.*2000;75:65.
 111. Gill US, Schwartz HM, Bigras L. Results of multiyear international interlaboratory comparison program for mercury in human hair. *Arch Environ Contam Toxicol* 2002;43; 466-72.
 112. González F, Schalscha E, Becerra J, Silva M. Mercury in a marine trophic chain. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2002;68:448-454
 113. Gonzalez-Muñoz MJ, Peña A, Meseguer I. Monitoring heavy metal contents in food and hair in a sample of young Spanish subjects. *Food and Chemical Tox.* 2008;46;3048-3052.
 114. Gottschalk LA, Rebello T, Buchsbaum MS, Tucker HG, Hodges EL. Abnormalities in hair trace elements as indicators of aberrant behaviour. *Compr Psychiatry* 1991;32(3):229-237.
-

-
115. Goullé JP, Mahieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Lainé G, Bouige D, Lacroix Ch. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair Reference values. *Forensic Science Intern.* 2005;153:39-44.
 116. Grandjean P, Budtz-Jorgensen E, Keiding N, Weihe P. Underestimation of risk due to exposure misclassification. *Int J Occup Med Environ Health* 2004;17(1):131-6.
 117. Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, et al. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1997;19(6):417-28.
 118. Grandjean P. late insights into early origins of disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:94-9
 119. Grandjean P. Methylmercury toxicity and functional programming. *Reprod Toxicol* 2007;23:414-20
 120. Granero S, Llobet JM, Schuhmacher M, Corbella J, and Domingo JL. Biological monitoring of environmental pollution and human exposure to metals in Tarragona, Spain. I. Levels in hair of school children. *Trace Elem. Res.* 1998; 15:39-43.
 121. Guallar E, Sanz-Gallardo I, Van't Veer P, Bode P, Aro A, Gómez- Aracena J, et al. Mercury, fish oils and the risk of myocardial infaction. *N Engl J Med* 2002; 347:1747-54.
 122. Harada M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *CRC Crit Rev Toxicol* 1995;25:1-24.
 123. Harnly JM. Instrumentation. En: Jackson KJ. *Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry*. Ed. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England, 1999.
 124. Hasan MY, Kosanovic M, Fahim MA, Adem A, Petroianu G. Trace Metal Profiles in Hair Samples from Children in Urban and Rural Regions of the United Arab Emirates. *Vet Human Toxicol* 2004;46(3).
 125. Hasegawa T, Haraguchi H. ICPs in analytical atomic spectrometry. Montanser A, Golightly DW, Eds, 2d ed. (VCH, New York, 1992)
 126. HBM-Values. www.umweltbundesamt.de/gesundheit-e/monitor/index.htm.
 127. Hecham E, Larbi I, Coquery M, Azemard S, Abdellah E, Benlemlih M, Saghi M, Cubadda F,. (2007). Food Additives & Contaminants: Part A. 2007;24;11:1236-1246 // Hair mercury levels in relation to fish consumption in a community of the Moroccan Mediterranean coast. Taylor & Francis 2007.
 128. Heitland P, Helmut D. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS. *J. of Trace Elem.* 2006;20:253-262.
 129. Hightower J, Moore D, Mercury levels in high-End consumers of fish. *Environ. Healt Persp* 2003; 111: 2.
 130. Holcome JA, Gilmutdinov AK. Fundamental Chemical and Physical Processes in Electrothermal Atomizers: En K.J. Jackson. *Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England 1999
-

-
131. Holmes P, James K.A.F, Levy L. S. Is low- level environmental mercury exposure of concern to human health. *Scienc. of the Total Environment* <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/mercury>.
 132. Ibarluzea J, Alvarez-Pedreroi M, Guxens M, Santa Marina L, Basterrechea M, Lertxundi A, Etxeandia A, Goñi F, Vioque J, Ballester F, Sunyer J, on behalf of the INMA Project. Sociodemographic, reproductive and dietary predictors of organochlorine compounds levels in pregnant women in Spain. *Chemosphere* 2011;82:114-120.
 133. IFCS/Forum V 04-TS. Forum V. Efectos colaterales no deseados de los productos químicos: Metales. 25–29 sept. 2006.
 134. Imai S, Kubo Y, Yonetani A, Ogawa N, Kikuchi Y. *J Anal At Spectrom* 13:1199-1202 (1998)
 135. Information Note.- Methyl Mercury in fish and fishery products. European Commission-Brussel 2008.
 136. Informe del Comité Científico de la AESAN en relación a los niveles de mercurio establecidos para los productos de la pesca. Ref. AESAN-2010-008.
 137. Innis SM, Palaty J, Vaghri Z, Lockith G. 2006. Increased levels of mercury associated with high intakes among children from Vancouver. *Canadá J. Pediatr*. 148:759-763
 138. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). Límites de exposición profesional para agentes químicos en España. 2009. Disponible en URL: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valores_Limite/LEP2009%20.pdf
 139. IPCS. Environmental Health Criteria 101. Methylmercury. Geneva; 1990.
 140. IUPAC. Analytical Chemistry División, Commission on Analytical Nomenclature. Recommendations on nomenclature of scales of working in analysis. *Information Bulletin*, n 18, Oxford, February, 1972 (INT)
 141. Iyengar GV. Reevaluation of the trace element content in reference man. Elsevier Science Pub. B.V. 1998;51,no 4-6:545-560.
 142. Iyengar GV. Reference values for elemental concentrations in some human samples of clinical interest: a preliminary evaluation. Elsevier Science Pub. B.V. 1984;38:125-131.
 143. Jackson KW, Chen G. Atomic absorption, atomic emission, and flame emission spectrometry. *Anal Chem* 68:231R-256R (1996)
 144. Jackson KW. Electrothermal atomic absorption spectrometry and related techniques. *Anal Chem* 72:159R-167R (2000)
 145. James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor D and Neubrandner J. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J. Clin Nutr* 2004;80:1611-7.
-

-
146. JECFA (Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/OMS). Expert Committee on Food Additives). Sixty seven meeting in Rome 20-29 June 2006
 147. Kern J, Grannemann B, Trivedi M, Adams JB. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part. A: current issues: Sulfhydryl-Reactive Metals in Autism. 2007;70:8,715-721.
 148. Kim Y, Kim BN, Hong Y, Shin MS, Yoo HJ, Kim JW, Bhang SY, Cho SC. Co-exposure to environmental lead and manganese affects the intelligence of school-aged children. NeuroToxicology 2009;985.
 149. Kjellström T, Kennedy P, Wallis S, Stewart A, Friberg L, Lind B, et al. Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish: stage 2. Interviews and psychological tests at age 6. Natl Swed Environ Board Rep 1989;3642.
 150. Klevay LM, Bistrian BR, Fleming CR, Neumann CG. Hair analysis in clinical and experimental medicine. Am J Clin Nutr 1987;vol.46,no2:233-236
 151. Kocot K, Zachwieja Z, Chlopicka J, Krosniak M. The content of selected trace elements and heavy metals in the hair of children from Chorzow. Pediatr Pol. 1996;71(1):31-6.
 152. Konofal E, Lecendreux M, Arnulf I, Mouren MC. Iron Deficiency in Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Arch Pediatr Adolesc Med. 2004;158:1113-1115
 153. Kurland LT FSSH. Minamata Disease. The Outbreak of a Neurologic Disorder in Minamata, Japan, and Its Relationship to the Ingestion of Seafood Contaminated by Mercury Compounds. World Neurol 1960;1:370-95.
 154. Lam JW, McLaren JW. J Anal Atom Spectrom 5:419-424 (1990)
 155. Lamand A, Favier A, et Pineau A. La détermination des oligoéléments dans les poils et dans les cheveux; intérêt et limites. 1994: 48:433-442
 156. Lanphear B, Hornung R, Khoury J, Yolton K. Low-Level Environmental Lead Exposure and Children's Intellectual Function: An International Pooled Analysis. Environmental Health Perspectives 2005;113:7 pg. 894
 157. Lanphear BP, Dietrich KN, Auinger P. Cognitive deficits associated with blood lead levels <10 g/dL in U.S. Children and adolescents. Public Health Reports 2000;115:521-529.
 158. Laskshmi MD, Geetha A. Level of Trace Elements (Copper, Zinc, Magnesium and Selenium) and Toxic Elements (Lead and Mercury) in the Hair and Nail of Children with Autism. Biol Trace Elem Res. 2011;142:148-158.
 159. Lech T. Lead, Copper, Zinc and Magnesium Content in Hair of Children and Young People with Some Neurological Diseases. Journal of Abnormal Child Psychology, 1985, vol 13, n° 2: 185-198.
 160. LeClair J, Quig W. Mineral Status, Toxic Metal Exposure and Children's Behaviour. Journal of Orthomolecular Medicine 2001;vol.16,no1,pg.13.
-

-
161. Leermakers M, Baeyens W, Quevauviller P, Horvat M. Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *Trends in Analytical Chemistry*. 2005;vol.24,no.5:383.
162. Legrand M, Arp P, Ritchie Ch, Man Chan H. Mercury exposure in two coastal communities of the Bay of Fundy, Canadá. *Env Res* 2005;98:14-21.
163. Letz R, Gerr F, Cragle D, Green C, Watkins J, Fidler AT. Residual Neurologic Deficits 30 Years after Occupational Exposure to Elemental Mercury. *Neurotoxicology* 2000;21:459-74.
164. Li D, Sham P, Owen M, He L. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Human Molecular Genetics*, 2006;vol.15,no 14:2276-2284.
165. Lidsky T, Schneider S. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *ProQuest Health and Medical Complete* 2003;126:5-19.
166. Lisboa J, Andrade J, Lemos B, Simião de Souza S, Barbosa F. A fast method for the determination of 16 elements in hair samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) with tetramethylammonium hydroxide solubilisation at room temperature. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. RSCPublishing 2008.
167. Lisboa J, Lemos B, Andrade J, Sousa CJ, Barbosa F. B39:Evaluation of human hair as a possible surrogate of whole blood and plasma to diagnose deficiency to essential elements and exposure to toxic elements; B40:CAT gene C(-262)T polymorphism in oral cancer; B41:Concentration of dialkylphosphate metabolites of organophos-phate pesticides in pregnant women's urine in the island of Crete; B42:DNA damage in reproductive tissues of DNA repair deficient and wild type male mice after exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicology Letters ISOS* (2008):S32-S246
168. Long GL y Winefordner JD. Limit of Detection. *Anal Chem* 55(7):A712 (1983)
169. Los niveles de mercurio en sangre en niños pequeños y mujeres en edad fértil --- Estados Unidos, 1999-2002. *MMWR*. 2004;53(43);1018-1020.
170. Los secretos del sistema immune: Autismo y PDD. www.greatplainslaboratory.com/spanish/immune.html. 2008.
171. Magos L, Clarkson T. The assessment of the contribution of hair to metil Mercury excretion. *Toxicology Letters* 2008;182:48-49.
172. Mahaffey K, Clickner R, and Bodurow C. Blood Organic Mercury and Dietary Mercury Intake: National Health and Nutrition Examination Survery, 1999 and 2000. *Environmental Health Perspectives* 2004; 1121;51, pg 562.
173. Man CK, Zheng YH. Analysis of trace elements in scalp hair of mentally retarded children. *J. of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2002;253,no 3:375-377.
174. Marlowe M, Cossairt A, Moon Ch. Main and Interaction Effects of Metallic Toxins on Classroom Behavior. *Journal of Abnormal Child Psychology* 1985;13:185-198
-

-
175. Marques R, Dórea J, Bastos W, Malm O. Changes in children hair-Hg concentrations during the first 5 years: Maternal, environmental and iatrogenic modifying factors. *Toxicology and Pharmacology* 2007;vol 49, pp 17-24.
 176. Martí-Cid R, Bocio A, Llobet JM, and Domingo JL. Intake of chemical contaminants through fish and seafood consumption by children of Catalonia, Spain: Health risks. *Elsevier Ltd.*2007;45(10):1968-74.
 177. Martí-Cid R, Llobet J.M, Castell, Domingo JL. Dietary intake of arsenic, cadmium, Mercury and lead by the population of Catalonia, Spain. *Biol Trace Elem Res* (2008) 125:120-132
 178. Martín VJ. 2002. Consumo de productos de la pesca. Distrución territorial. Distribución y consume. 65:73-79.
 179. McDowell M, Dillon Ch, Osterloh J, Bolger P, Pellizzari E, Ruben R, Schober S, Sinks T, Jones R, and Mahaffey K. Hair Mercury Levels in U.S. Children and Women of Childbearing Age: Reference Range Data from NHANES 1999-2000. *Environmental Health Perspectives* 2004;112;11,pg 1165.
 180. Mckeivey W, Gwynn R, Jeffery N, Kass D, Thorpe L, Garg R, Palmer C an Parsons P,. A Biomonitoring Study of Lead, Cadmium, and Mercury in the Blood of New York City Adults. *Environmental Health Perspectives* 2007; vol.115,pg. 1435.
 181. Mehra R, and Juneja M. Fingernails as biological indices of metal exposure. *J.Biosci* 2005;30(2):253-257.
 182. Menezes-Filho JA, Paes C, Pontes A, Moreira JC, Sarcinelli P, Mergler D. High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant. *NeuroToxicology* 2009. *Neutox* 996 1-7.
 183. Mercury Exposure in Industrialized Countries. *Environmental Health Perspectives* 2005;113(5):590.
 184. Mergler D, Anderson HA, Chan LH, Mahaffey KR, Murray M, Sakamoto M, et al. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio* 2007;36(1):3-11.
 185. Meyer-Baron M, Schaeper M, and Seeber A. A meta-analysis for neurobehavioural results due to occupational mercury exposure. *Arch Toxicol* 2002;76:127-136.
 186. Miekelev N, Dias MTW, Porto da Silveira CL,. How reliable are human hair reference intervals for trace elements?. *Elsevier Science B.V.*1998:218:9-17.
 187. Miekeley N, de Carvalho LM, Porto da Silveira CL and Lima MB. Elemental anomalies in hair as indicators of endocrinologic pathologies and deficiencias in calcium and bone metabolism. *Trace Elm.Med.Biol.*2001;15:46-55.
 188. Minder B, Das-Smaal E, Brand E, Orlebeke J. Exposure to Lead and Specific Attentional Problems in Schoolchildren. *Journal of Learning* 1994;vol 27,no 6:393-399.
 189. Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino. Fichas de consumo alimentario. Julio 2007-Junio. En URL: http://www.mapa.es/alimentacion/pags/consumo/año_movil_jul07-jun08/fichas_consumo.pdf

-
190. Mohammed N. Elemental Contents in Hair of Children from Two Regions in Dar Es Salaam. *Int. J. Anal. Chem.* 2012;495043, pág.1/5.
 191. Monteagudo M, and Fabricio A. Evaluación de la contaminación por mercurio en población de mineros artesanales de oro de la Comunidad de Santa Filomena –Ayacucho- Perú, durante el período de agosto 2000 – septiembre 2001.
 192. Montero Barrientos MT. Espectroscopía de absorción atómica. En: Valls O, Del Castillo B. *Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud*. Ed. Piro (1998)
 193. Montuori P, Jover E, Díez S, Ribas-Fitó N, Sunyer J, Triassi M, Bayona JM. Mercury speciation in the hair of pre-school children living near a chlor-alkali plant. *Science of the total Env.* 2006;369:51-58.
 194. Moreiras O, Cuadrado C, Kumpulainen JT, Carbajal A, Ruiz-Roso B. Intake of contaminants, heavy metals and nutrients with potential toxicity via total diet in four geographical areas of Spain. *FAO regional Office for Europe, REU Technical series 49. Trace elements, natural antioxidants and contaminants in European foods and diets*. Rome: FAO,1996; 59-92
 195. Muñoz MJ, Soler M, Mateos CJ. Elementos ultrazas ¿Nutrientes o tóxicos?. Universidad de Alcalá (Madrid). *Rev. Toxicol.* 2009;26:93-103
 196. Muntner P, Menke A, DeSalvo KB, Rabito F, Batuman V. Continued Decline in Blood Lead Levels Among Adults in the United States. *Arch Intern Med* 2005;165(18):2155-2161.
 197. Murata K, Budtz-Jorgensen E, and Grandjean P. Benchmark Dose Calculations for Methylmercury-Associated Delays on Evoked Potential Latencies in Two Cohorts of Children. *Risk Analysis* 2002;vol.22,no 3,pg 465.
 198. Murata K, Sakamoto M, Nakai K, Weihe P, Dakeishi M, Iwata T, Jie X, Ohno T, Kurosawa T, Kamiya K, Satoh H. Effects of methylmercury on neurodevelopment in Japanese Children in relation to the Madeiran study. *Int arch occup Environ health* 2004;77:571-579.
 199. Murata K, Weihe P, Budtz-Jorgensen E, Jorgensen P, Grandjean P. Delayed Brainstem Auditory Evoked Potential Latencies in 14-Year-Old Children exposed to Methylmercury. *J.Pediatr* 2004;144:177-183.
 200. Myers G, Davidson P, Cox Ch, Shamlaye C, Palumbo D, Cernichiari E, Sloae-Reeves J, Wildin G, Kost J, Li-Shan H, Clarkson T. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *The Lancet* 2003;361:1686-1692
 201. Nadal M, Bocio A, Schuhmacher M, Domingo JL. Monitoring Metals in the Population Living in the Vicinity of a Hazardous Waste Incinerator. *Biol. Trace Elem. Res.* 2005; vol.104, pg. 203
 202. Nadal M, et al. Table 5. A summary of a number of Studies on Metal Concentrations (in µg/g) in Hair of Children and Adults from Different Region and Countries. *Biol. Trace Elem. Res.* 2005; vol.104, pg. 210.
 203. National Research Council, Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury. *Toxicological Effects of Methylmercury* National Academy Press, Washington DC 2000. Disponible en URL: http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=9899&page=R1
-

-
204. National Research Council. Recommended Dietary Allowances. Food and Nutrition Board, National Academy of Sciences- National Research Council; 10 th edition. National Academy Press. Washington D.C. (USA) 1989.
 205. NCHS.2003. national health and Nutrition examination survey. Hyattsville, Md: National Center for Health Statistic
 206. Oken E, O.Wright R, Kleinman K, BNellinger D, Amarasiriwardena Ch, Hu H, Rich-Edwards J, and Gillman M. Maternal Fish Consumption, Hair Mercury, and Infant Cognition in a U.S. Cohort. E. Environmental Health Perspectives 2005;113,no 10:1376-1380.
 207. OMS. El tioromarsal y las vacunas. Jun 2006. Disponible en URL: http://www.who.int/vaccine_safety/topics/thiomersal/questions/es/print.html
 208. Oral presentations: Benito e, Obrador A, Moreno V, Cabeza E, Bosch X, Muñoz N. Diet and colorectal adenomas a case-control study in Majorca. European J. of Cancer Prevention 1991; vol 1:19.
 209. Orden PRE/222/2009, de 6 de febrero, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (dispositivos de medición que contienen mercurio). BOE 2009 Feb 12;37:14842-3.
 210. Ortega J.A, Ferris J, Cánovas A, garcía J. Neurotóxicos medioambientales (y II). Metales: efectos adversos en el sistema nervioso fetal y posnatal. Acta Pediatric Esp. 2005; 63: 182-192
 211. Ortega JA, Vazquez JM, Velez D, López JA, Sánchez-Soils. Grupo de Investigación HERMES: evaluación de la exposición dietética a metilmercurio en poblaciones vulnerables de la Región de Murcia (España) Anales de Pediatría 2007, vol.66, nº 04, pg 426-428.
 212. Ortega-Garcia JA, RodrigueZ K, Calatayud M, Martín M, Velez D, Devesa V, Sanchez- Alarcón C, Torres A, Galindo C, Gil- Vazquez JM, Sánchez M, Sanchez Solis M, Alfonso B, Romero F. Estimated intake levels of methyl mercury in children, childbearing age and pregnant women in a Mediterranean region, Murcia, Spain . Eur J. Pediatr 2009; 168:1075-1080.
 213. Palmer R, Blanchard S, Wood R. Proximity to point sources of environmental mercury release as a predictor of autism prevalence. Health & Place 2009;15:18-24.
 214. Park HS, Shin KO, Kim JS. Assessment of Reference Values for Hair Minerals of Korean Preschool Children. Biol Trace Elem Res. 2007;vol.116(2):119-30.
 215. Passos CJS, Mergler D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review . Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro 2008;24(4):503-20.
 216. Peraza MA, yala-Fierro F, Barber DS, Casarez E, Rael LT. Effects of micronutrients on metal toxicity. Environ Health Perspect 1998;106. Suppl 1:203-16.
 217. Pereira R, Ribeiro R, Gonçalves F. Scalp hair analysis as a tool in assessing human exposure to heavy metals (S. Domingos mine, Portugal). Elsevier Science B.V. 2004;327:81-92.
-

-
218. Perkin Elmer Instruments. FIAS 400 y ELAN 6100 DRC hardware guide 017228B. Perkin Elmer (2000)
219. Perrone L, Moro R, Caroli M, Di Toro R, Gialanella G. Trace Elements in Hair of Healthy Children Sampled by Age and Sex. Humana Press Inc.1996;vol 51,pg 71.
220. Pesce AJ, Kaplan LA. Apéndices. En: Pesce AJ, Kaplan LA. Química Clínica Métodos. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. 1990.
221. Pesch A, Wilhelm M, Rostek U, Schmitz N, Wishoff-Rouben M, Ranft U, and Idel H. Mercury concentrations in urine, scalp hair, and saliva in children from Germany. Journal of Exposure Analysis and Environ Epidemiol. 2002;12:252-258.
222. Phil O.R, Parkes. M. Hair Element Content in Learning Disabled Children. Science, vol 198,pg 204-206.
223. Piotrowski J, Trojanowska B, Mozilnicka EM. Excretion kinetics and variability of urinary mercury in workers exposed to mercury vapor. Int Arch Occup Environ Health 35:245-256 (1975)
224. Pleban PA, Pearson KH. Determination of cadmium in whole blood and urine by Zeeman atomic absorption spectrometry. Clin Chim Acta 99:267-277 (1979)
225. Plusquellec P, Muckle G, Dewailly E, Ayotte P, Jacobson SW, Jacobson JL. The relation of low-level prenatal lead exposure to behavioral indicators of attention in Inuit infants in Arctic Quebec. Elsevier Inc. Neurotoxicology and Teratology (2007) 29 527-537.
226. Pohl B, Grund A, Knowles M. Selenium Determination in Blood with Atomic-Absorption Spectrometry (AAS) using Zeeman Background Correction and Palladium Ascorbic-Acid Chemical Modification. Fresenius' Z Anal Chem 327(1):20-21 (1987).
227. Potter S, Matrone G. Effect of selenite on the toxicity of dietary methyl mercury and mercuric chloride in the rat. J Nutr 104(5):638-647 (1974)
228. Pruszkowski E, Neubauer K, Thomas R. An Overview of Clinical Applications by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Atomic Spectroscopy. ISSN 0195-5373. 1998;vol.19,no 4, pp.111-115 (11 ref.)
229. Rademeyer CJ, Radziuk B, Romanova N, Skaugset NP, Skogstad A, Tomasen Y. J. Anal At Spectrom 10:739 (1995)
230. Rademeyer, CJ. Temperature: Its Significance, Control and Measurement. En K.J. Jackson. Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England 1999.
231. Ramón R, Ballester F, Aguinagalde X, Amurrio A, Vioque J, Lacasaña M, Rebagliato M, Murcia M, and Iñiguez C. Fish consumption during pregnancy, prenatal mercury exposure, and anthropometric measures at birth in a prospective mother-infant cohort study in Spain. Am J. Clin Nutr 2009;90:1047-55.
232. Ramón R, Murcia M, Aguinagalde X, Amurrio A, Llop S, Ibarluzea J, Lertxundi A, Alvarez-Pedrerol M, Casas M, Vioque J, Sunyer J, Tardon A, Martinez-Arguelles B, Ballester F. Prenatal mercury exposure in a multicenter cohort study in Spain. Elsevier B.V. 2010;12.004.
-

-
233. Ramón R, Murcia M, Ballester F, Rebagliato M, Lacasaña M, Vioque J, Llop S, Amurrio A, Aguinagalde X, Marco A, León G, Ibarluzea J, Ribas-Fitó N. Prenatal exposure to mercury in a prospective mother-infant cohort study in a Mediterranean area, Valencia, Spain. Elsevier B.V. 2007;11:025.
234. Randall V, and Ebling FJ. Seasonal changes in human hair growth. British Journal of Dermatology 1991;124:146-151.
235. Rayman MP. The importance of selenium to human health. The Lancet 356:233-241(2000)
236. Razagui IB, and Ghribi I. Maternal and Neonatal Scalp hair concentrations of Zinc, Copper, Cadmium, and Lead: relationship to some lifestyle factors. Biol Trace Elem Res. 2005;vol.106(1):1-28.
237. Revich BA. Lead in Hair and Urine of Children and Adults from Industrialized Areas. Archives of Environmental Health: An Int J. 1994;vol. 49, Issue 1. pgs.59-62.
238. Rodrigues J, Batista B, Nunes J, Passos C, Barbosa F, Evaluation of the use of human hair for biomonitoring the deficiency of essential and exposure to toxic elements. Elsevier Science B.V.2008, vol.405 Issue 1-3, p370-376, 7p.
239. Rodríguez MA, Navarro M, Cabrera C, López MC. Elementos tóxicos en alimentos, bebidas y envases. Alimentaria, mayo 01/23.
240. Rodushkin I and Axelsson MD. Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden. Elsevier Science Pub. B.V. 2000;262:21-36.
241. Rodushkin I, Odman F. Application of inductively coupled plasma sector field mass spectrometry for elemental analysis of urine. J Trace Elem Med Biol 14:241-247 (2001)
242. Rojas D, Sánchez MA, Olivares W. Spectrochim Acta Part B 52B:1269-1281 (1997).
243. Röllin H, Mathee A, Levin J, Theodorou P, Wewers F. Blood manganese concentrations among first-grade schoolchildren in two South African cities. Environmental Research 2005;97:93-99.
244. Rouge B, SafeMinds, Chemistry Department, University of Kentucky. Reduced Levels of Mercury in First Baby Haircuts of Autistic Children. Int. J. of Toxicology 2003;22:277-285.
245. Rubio C, Gutiérrez A, Burgos A, and Hardisson A (2008). Food Additives & Contaminants: Part A. 2008;25;8:946-952 // Total dietary intake of mercury in the Canary Islands, Spain. Publisher: Taylor & Francis 2008.
246. Rubio C, Gutierrez A, Burgos A, Hardisson. Total dietary intake of mercury in the Canary Islands, Spain Food Additives and Contaminants2008; 25: 946-952
247. Sabé R, Rubio R, García-Beltrán L. Determination of selenium in human blood specimens by electrothermal atomic absorption. Analítica Chimica Acta 419:121-135 (2000)
-

-
248. Sachdev H, Gera T, Nestel P. Effect of iron supplementation on mental and motor development in children: systematic review of randomised controlled trials. *Public Health Nutrition* 2004; 8(2):117-132
249. Sahuquillo I, Lagarda MJ, Silvestre M, and Farré RI. Food Additives Contaminants: Part A. Taylor & Francis 2007;24,8:869-876. Methylmercury determination in fish and seafood products and estimated daily intake for the Spanish population. Univ.Complutense de Madrid.2010.
250. Sahuquillo I, Lagarda MJ, Silvestre MD .Methyl mercury determination in fish and seafood products and estimated daily intake for the Spanish population. *Food Addit Contam* 2007;24:869-876
251. Sakai T, Warishi M, Nishiyama K. Changes in Trace Element Concentrations in Hair of Growing Children. Humana Press Inc. 2000; vol.77, pg 43.
252. Salonen JT, Seppanen K, Nyyssonen K, Korpela H, Kauhanen J, Kantola M. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation* 1995;91:645-55.
253. Salonen JT, Seppanen K, Lakka TA, Salonen R, Kaplan GA. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis* 2000;148:265-73.
254. Sanna E, Liguori A, Palmas L, Soro MR, Floris G. Blood and hair lead levels in boys and girls living in two Sardinian towns at different risks of lead pollution. *Academic Press (AP). Ecotoxicology and Environmental Safety* 2003;55:293-299.
255. Sanzo JM, Dorronsoro M, Amiano P, Aguinagalde F, Azpiri P, Estimation y validation of mercury intake associated with fish consumption in an EPIC cohort of Spain. *Public Health Nutr.* 2001; 4: 981-988
256. Schlegel-Zawadzka M. Chromium content in the hair of children and students in southern Poland. *Biol Trace Elem Res.* 1992;32:79-84.
257. Schlemmer G. Graphite furnace AAS for complex samples: Detection limits. precision, long-term stability. *Atomic Spectroscopy* 17(1):15-21 (1996)
258. Schmit JP, Youla M, Gélina Y. Multi-element analysis of biological tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 249:495-501 (1991).
259. Schroeder HA, Nason AP. Trace Element analysis in Clinical Chemistry. *Clin Chem* 1971;17: 461-474
260. Schuhmacher M, Domingo JL, Llobet JM, Corbella J, Lead in children's hair, as related to exposure in Tarragona Province, Spain. Elsevier Science Publishers B.V. (Elsevier S.), Amsterdam. *The Science of the Total Environment*, (1991) 104; 167-173
261. Schumacher M, Batiste J, Bosque MA, Domingo JL, Corbella J. Mercury concentrations in marine species from the coastal area of Tarragona province, Spain . Dietary intake of mercury through fish and seafood consumption. *Sci Total Environ.* 1994;156: 269-273.
-

-
262. Seifert B, Becker K, Helm D, Krause C, Schulz C, and Seiwert M. The German Environmental Survey 1990/1992 (GerES II): reference concentrations of selected environmental pollutants in blood, urine, hair, house dust, drinking water and indoor air. *J of Exposure Anal and Env Epidemiology* 2000;10:552-565.
263. Senofonte O, Violante N and Caroli S. Assessment of reference values for elements in human hair of urban schoolboys. *J Trace Elements Med. Biol.* 200;14, pp 6-13.
264. Shah F, Gul T, Imran H, Kazi N, Ahmed J, Qadir A, Khan S, Kolchi N, Kumar S. Evaluation of Status of Trace and Toxic Metals in Biological Samples (Scalp Hair, blood and Urine) of Normal and Anemic Children of Two Age Groups. *Biol Trace Elem Res.*2011;141:131-149.
265. Shaw W. The Zeeman effect in furnace AA. En: *Analytical methods for graphite tube atomizers*. Ed. Varian Australia Pty Ltd, Mulgrave, Victoria, Australia (1988)
266. Shim SM, Ferruzzi MG, Kim YC, Janle EM, Sangerre CR. Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chem* 2009;112:46-50.
267. Shoeman K, Bend JR, Hill J, Nash K, Koren G. Defining a Lowest Observable Adverse Effect Hair Concentrations of Mercury for Neurodevelopmental Effects of Prenatal Methylmercury Exposure Through Maternal Fish Consumption: A Systematic Review. *Ther Drug Monit* 2009;31:670-682.
268. Simmons-Willis TA, Koh AS, Clarkson TW, Ballatori N. Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. *Biochem J* 2002;367(1):239-46.
269. Skerfving S. Heavy metal toxicology. *Appl Radiat Isot* 49(5- 6):697 (1998)
270. Skoog DA, Leary JJ. Métodos radioquímicos. En: Skoog DA, Leary JJ. *Análisis Instrumental 4ª Edición*. McGraw-Hill/Interamericana de España SA (1993) pp 470-490
271. Skoog DA, Leary JJ. Espectrometría de masas. En: Skoog DA, Leary JJ. *Análisis Instrumental 4ª Edición*. McGraw-Hill/Interamericana de España SA (1993) pp 491-537
272. Skoog DA, Leary JJ. Espectroscopía de emisión basada en la atomización con plasma, arco o chispa. En: Skoog DA, Leary JJ. *Análisis Instrumental 4ª Edición*. McGraw- Hill/Interamericana de España SA (1993) pp 272-295
273. Skoog DA, Leary JJ. Espectroscopía de emisión basada en la atomización con llama y electrotérmica. En: Skoog DA, Leary JJ. *Análisis Instrumental 4ª Edición*. McGraw- Hill/Interamericana de España SA (1993) pp 227-271
274. Slavin W, D.C. Manning DC, Carnrick GR. The stabilized temperature platform furnace. *At Spectrosc* 2(5):137-145 (1981)
275. Slavin W. Graphite furnace AAS for biological materials. *The Science of the Total Environment* 71:17-35 (1988)
-

-
276. Smith RG, Vorwald AJ, Patil LS, Mooney TF Jr. Effects of exposure to mercury in the manufacture of chlorine. *Am Ind Hyg Assoc J* 31(6):687-700 (1970)
277. Sociedad Española de Sanidad Ambiental (SESA). 20ª Jornada SESA "Vigilancia Biológica de la Exposición a Sustancias Químicas en Población Española". Avance de Conclusiones y Recomendaciones a la Administración Sanitaria. 10 Marzo 2011.
278. Soden S, Lowry J, Garrison CB, Wasserman G. 24-Hour provoked urine excretion test for heavy metals in children with autism and typically developing controls, a pilot study. *Clinical Toxicology* 2007;145:476-481.
279. Song Q, Yong C, Song H, Wang M, Ling W, Qing W, Qing X, Tao Y, and Rao S. Behavioural development of school-aged children who live around a multi-metal sulphide mine in Guangdong province, China: across-sectional study.
280. Spurgeon A. Prenatal Methylmercury Exposure and Developmental Outcomes: Review of the evidence and Discussion of Future directions. *Env Health Persp* 2006;114,no 2:307.
281. Srogi K. Mercury content of Hair in different populations relative to fish consumption. *Rev Environ Contam Toxicol* 2007;189:107-130
282. Steindel S, Howanitz P. The Uncertainty of Hair Analysis for Trace Metals. *Jama* 2001;285:83-85
283. Steven G, Bernard W. A rationale for lowering the blood lead action level from 10 to 2 µg/dL. Elsevier Inc. *Neurotoxicology* 2006;27:693-701
284. Sukumar A. Factors Influencing Levels of Trace Elements. *Rev. Environ Contam Toxicol Verlag* 2000;175:47-78.
285. Table 1. INMA Cohorts. Child health and the environment: the INMA Spanish Study. Pg. *Journal Compilation* 2006. Blackwell Publishing Ltd. 2006;20:403-410.
286. Takser L, Mergler D, Hellier G, Sahuquillo J, Huel G. Manganese, Monoamine Metabolite Levels at Birth, and Child Psychomotor Development. *NeuroToxicology* 24(2003):667-674.
287. Tetsuro a, Kunito T, Iwata H, Monirith I, Seang Tana T, Subramanian A, Tanabe S. Mercury contamination in human Hair and fish from Cambodia: levels, specific accumulation and risk assesment. *Environmental Pollution* 2005; 134: 79-86.
288. Tetsuya E, Koichi H. Hair Mercury Levels in hair samples from residents of Taiji, a Japanese whaling town. *Marine pollution Bulletin* 2009; in press
289. Thomas R. A beginner's guide to ICP-MS. Part I. Spectroscopy 16(4):38-42 (2001)
290. Thomas R. A beginner's guide to ICP-MS. Part II. The sample-introduction system Spectroscopy 16(5):56-60 (2001)
291. Thomas R. A beginner's guide to ICP-MS. Part III. The plasma source. Spectroscopy 16(6):26-30 (2001)
-

-
292. Thomas R. A beginner's guide to ICP-MS. Part IV. The interface region. Spectroscopy 16(7):26-28 (2001)
293. Thomas R. A beginner's guide to ICP-MS. Part IX. Collision/Reaction cell technology Spectroscopy 17(2):42-48 (2002)
294. Thomas R. A beginner's guide to ICP-MS. Part V. The ion focusing system. Spectroscopy 16(9):38-44 (2001)
295. Thomas R. A beginner's guide to ICP-MS. Part VI. The mass analyzer. Spectroscopy 16(10):44-48 (2001)
296. Thomas R. A beginner's guide to ICP-MS. Part VIII. Mass analyzers: Time-of-flight technology Spectroscopy 17(1):36-41 (2002)
297. Torralba A, Borrajo E, Gil A, Canteras M, Cervantes A, Mingorance MD. Nutritional state as reflected in chromium levels in a population of healthy and diabetic children. An Esp.Pediatr. 1992;36:125-8.
298. Torrente M, Colomina MT, domingo JL. Metal Concentrations in Hair and Cognitive Assessment in an Adolescent Population. Trace Elem. Res. 2005; 104
299. Torrente M, Colomina MT, Domingo JL. Metal Concentrations in Hair and Cognitive Assessment in an Adolescent Population. Biol Trace Elem Res. 2005, vol. 104, pg.215.
300. Trachtenber F, Barregard L, Mckinlay S. The influence of urinary flow rate on mercury excretion in children. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 2010;24:31-35.
301. Training for health care providers: Mercury and Lead. Children's Health and the Environment. OMS julio 2008. www.who.int/ceh.
302. Trasande L, Landrigan PJ, Schechter C. Public Health and Economic Consequences of Methyl Mercury Toxicity to the Developing Brain. Environ Health Perspect 2005;113:590-596.
303. Tuthill R. Hair Lead Levels Related to Children's Classroom Attention-Deficit Behavior. Archives of Environmental Health.. 1994; 214
304. Underwood EJ. Los minerales en la nutrición del ganado.Acribia, Zaragoza 1983
305. UNEP. Informe sobre el abastecimiento actual de mercurio y la demanda de esa sustancia, con inclusión de la posible eliminación de la extracción primaria de mercurio 2008. URL: http://www.chem.unep.ch/mercury/OEWG2/documents/f62/Spanish/OEWG_2_6_Add_1_s.pdf
306. United Nations Environment Programme (UNEP). Global Mercury Assessment. UNEP Chemicals Mercury Programme 2002. Disponible en URL: <http://www.chem.unep.ch/mercury/Report/GMA-report-TOC.htm>
307. United Nations Environment Programme (UNEP). Mercury Programme. Nuevos desarrollos en 2003 y en 2006. www.chem.unep.ch/
308. United States Environmental Protection Agency. EPA's Roadmap for Mercury. EPA 2006 Jul. Disponible en URL: <http://www.epa.gov/mercury/pdfs/FINAL-Mercury-Roadmap-6-29.pdf>
-

-
309. Urieta I, Jalón M, Eguilero I. Food surveillance in Basque country (Spain). *Food Addit Contam.* 1996;13:289-352
310. US EPA (US Environment Protection agency) Mercury Study Report to Congress; 1997
311. USDA Foreign Agricultural Service. Netherlands Fishery Products EU Fishery Marketing Report. 2008 Jun 5. Report No.: NL8009. Disponible en URL: <http://www.fas.usda.gov/gainfiles/200904/146347761.pdf>
312. Valls O. Espectrometría de masas. En: Valls O, Del Castillo B. *Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud*. Ed. Piro (1998).
313. Vasconcelos MT, Tavares H. Trace element concentrations in blood and hair of young apprentices of a technical –professional school. *Elsevier Science B.V.* 1997;205:189-199.
314. Vega LO, Arias JA, Monterrey P, Castro O, Moreno OL y Pérez L. Niveles de Metilmercurio en Pescados. *Alimentario*, marzo 01/89.
315. Vergani L, Lanza C, Rivaro P, Abelmoschi ML, Genti S, Veneselli E, Minniti G, Grasselli E, Canesi L, Voci A. Metals, metallothioneins and oxidative stress in blood of autistic children. *Research in Autism Spectrum Disorders* 2011;5:286-293.
316. Virtanen JK, Rissanen TH, Voutilainen S, Tuomainen TP. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *J Nutr Biochem* 2007;18:75-85.
317. Walker S, Wachs T, Meeks J, Lozoff B, Wasserman G, Pollitt E, Carter J, and the International Child development steering Group. Child development: in developing countries 2. www.thelancet.com 2007; vol.369
318. Wasserman G, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Factor-Litvak P, Van A, Slavkovich V, Lolacono N, Cheng Z, Hussain I, Montotaj H, Graziano J. Water Arsenic Exposure and Children's Intellectual Function in Arai-hazar, Bangladesh. *Children's Health. Environmental Health Perspectives* (2004) Vol.112 N° 13 Pág.1329
319. Wasserman G, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Levy D, Factor P, Kline J, Van Geen A, Slavhovich V, Lolacono N, Cheng Z, Zheng V, and Graziano J. Water Manganese Exposure and Children's Intellectual Function in Arai-hazar, Bangladesh. *The Environmental Health Perspectives*.2006;114,1,pg 124-129.
320. Wasserman G. A, Musabegovic, A, Liu X, Kline J. Lead exposure and motor functioning in 4 ½ year-old children: The Yugoslavia Prospective Study. *J. Pediatric* 200;137:555-61
321. Watras CJ, Back RC, Halvorsen S, Hudson RJ, Morrison KA, Wentz SP. Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *Sci Total Environ* 1998;219(2-3):183-208.
322. Wecker I, Miller S, Cochran S, Dugger D, Johnson W, Trace Element Concentrations in Hair From Autistic Children. *J. mens. Defic. Res* 1985;29;15-22.
323. Weil M, Bressler J, Parsons P, Bolla K, Glass T, Schwartz B. Blood. Mercury Levels and Neurobehavioral Function. *JAMA* 2005;293(15):1875-82.
-


-
324. Welch AA, Lund E, Amiano P, Dorronsoro M, Brustad M, Kumle M, Rodriguez M, Lasheras C, Janzon L, Jansson J, Luben R, Spencer EA, Overvad K, Tjønnelad A, Clavel-Chapelon F, Linseisen J, Klipstein-Grobusch K, Benetou V, Zavitsanos X, Tumino R, Galasso R, Bueno-de-Mesquita HB, Ocké MC, Charrondière UR and Slimani N. Variability of fish consumption within the 10 European countries participating in the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public health Nutr* 5(6b):1273-1285.
325. Wennberg M, Lundh T, Bergdahl I, Hallmans G, Jansson JH, Stegmayr B, Custodio HM, Skerfving S. Time trends in burdens of cadmium, lead, and mercury in the population of northern Sweden. *Environmental Res.* 2006;100:336-338.
326. WHO (World Health Organisation International Programme on Chemical Safety). Methylmercury (addendum); 2004
327. WHO (World Health Organisation). Exposure a Mercury: a major public health concern; 2007
328. WHO, UNEP. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. WHO 2008 Aug.; <http://www.chem.unep.ch/mercury/IdentifyingPopnatRiskExposuretoMercuryFinalAugust08.pdf>
329. WHO/ICPS. Elemental mercury and inorganic mercury compounds 2002. Concise International Chemical Assessment Document N°50. Disponible en URL: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad50.htm>
330. Wilhelm M, Hafner D, Lombeck I, and Ohnesorge FK. Monitoring of cadmium, copper, lead and zinc status in young children using toenails: comparison with scalp hair. *Elsevier Science Pub. B.V.* 1991;103:199-207.
331. Wilhelm M, Pesch A, Rostek U, Begerow J, Schmitz N, Idel H, Ranft U. Concentrations of lead in blood, hair and saliva of German children living in three different areas of traffic density. *Elsevier S. The Science of the Total Environment*, (2002) 297 109-118
332. Williams P, Hersh J, Allard A, Sears L. A controlled study of mercury levels in hair samples of children with autism as compared to their typically developing siblings. *Research in Autism Spectrum Disorders* 2008;2:170-175.
333. Wolfesperger M, et al. Table 2. ICP-MS operating conditions. *Sci Total Environ* 1994;156:235-242.
334. Wong S, Lye E. Lead, mercury and cadmium levels in Canadians. *Catalogue* 2008; no 82-003-x.
335. Wong V, Lee J, Wong W. Mercury Exposure in Children With Autistic Spectrum Disorder: Case-Control Study. *J. Child Neurol* 2004;19:431-434.
336. Woolf A, Wright R, Amarasiwardena C, Bellinger D. A child with chronic manganese exposure from drinking water. *Environ Health Perspect* 2002;110(6):613-6
337. Wright R, Amarasiwardena Ch, Woolf A, Jim R, Bellinger D. Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site. *Elsevier Inc. NeuroToxicology* 27 (2006) 210-216
-

www.efsa.europa.eu/en/press/news/contam040318.htm

338. Yasutake A, Matsumoto M, Yamaguchi M, Hachiya N. Current Hair Mercury Levels in Japanese for estimation of Methylmercury Exposure. *Journal of Health Science* 2004;50(2):120-123.
339. Yenigun A, Ozkinay F, Cogulu O, Coker C, Cetiner N, Ozden G, Aksu O, and Ozkinay C. Hair zinc level in down syndrome. *Down Syndrome Res. and Practice* 2004;9(2):53-57.
340. Yorbik Ö, Kurt I, Hasimi A, Öztürk Ö. Chromium, Cadmium, and Lead Levels in Urine of Children with Autism and Typically Developing Controls. *Humana Press Inc.* 2009.
341. Yoshizawa K, Rimm EB, Morris JS, Spate VL, Hsieh CC, Spiegelman D. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 2002;347:1755-60.
342. Zaichick S, Zaichick V,. Neutron Activation Analysis of Ca, Cl, I, K, Mg, Mn, Na, and Sr Contents in the Scalp hair of health humans. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, 2009;281:41-45
343. Zhang L, Wang Q. Preliminary study on health risk from Mercury exposure to residents of Wujiazhan town on the Di'er Songhua river, Northeast China. *Environmental Geochemistry and Health* 2006;28:67-71.
344. ZiaoJie L, Cheng J, Song Y, Honda S, Wang L, Liu Z, et al. Mercury concentration in hair samples from Chinese people in coastal cities. *J Environ Sci* 2008; 20(10):1258-62.
345. Zong YY, Parsons PJ, Slavin W. *Spectrochim Acta Part B* 53B:1031-1039 (1998).

8. Anexos:

Anexo I. Consentimiento Informado.


SERVICIO DE TOXICOLOGIA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo (Nombre y apellidos).....

He recibido información sobre el Ensayo de Investigación:
*“Establecimiento de valores de referencia de elementos traza en el
cabello de población infantil”.*

Comprendo que la participación de mi hijo/hija es voluntaria.

Por ello;

Autorizo a que mi hijo/hija(nombre y apellidos).....

.....

participe en el ensayo de investigación.

Fdo:

Fecha:

*Toda la información será tratada siguiendo las directrices de la ley Orgánica 15/1999, de 13 de
diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.*

Anexo II. Encuesta donde se reflejan las distintas variables.



SERVICIO DE TOXICOLOGIA

Nombre y apellidos.....

Fecha de nacimiento..... Peso.....

Talla.....

¿Toma alguna medicación?.....

¿Cuál?.....

¿Alguna observación que considere de interés?.....

*(Marque con una * lo que corresponda)*

¿Cuántos empastes metálicos (amalgamas) tiene?:

0..☐ 1-5..☐ 6-10..☐ 11-15..☐ 16-20..☐ Más de 20..☐

Consumo de pescado (veces a la semana):

0..☐ 1-2..☐ 3-4..☐ 5-6..☐ Más de 6..☐

La identificación personal no se utilizará en el estudio. El campo nombre y apellidos solo será necesario rellenar en caso de requerir resultados analíticos }

Anexo III. Carta de solicitud de petición a los colegios.



LABORATORIO DE TOXICOLOGIA

CEMILFARDEF

Estimados Sres:

El Servicio de Toxicología del Centro Militar de Farmacia de la Defensa (CEMILFARDEF) es el Centro de Referencia de las Fuerzas Armadas para la determinación de elementos traza en especímenes Biológicos. Asimismo, y en el ámbito nacional, es uno de los Centros punteros en la determinación de estos parámetros, gracias a que cuenta con las técnicas de análisis más complejas y novedosas que existen en la actualidad.

Consecuencia de su condición y espíritu de vanguardia, una de las principales actividades de este laboratorio es la investigación. En este sentido y debido a los pocos estudios fiables disponibles que establezcan valores de referencia de elementos traza (tanto esenciales en los procesos biológicos, como no esenciales e incluso tóxicos) en población infantil, este Centro ha abierto una línea de investigación al objeto de establecer los valores de referencia de estos elementos en el CABELLO.

Es el cabello un tipo de muestra de fácil obtención, aunque poco utilizada por la complejidad de su procesamiento y determinación, pero no por ello menos valiosa, dado que, en general, la cantidad de elementos minerales incorporados de forma irreversible en el cuero cabelludo es proporcional a la concentración de los mismos en otros tejidos del organismo

De esta forma, si lográsemos establecer estos valores de referencia, podríamos contribuir al avance en el conocimiento de diferentes enfermedades, mediante la toma de una muestra de tan fácil, barata e indolora obtención, como el cabello.

Es por ello y a tal fin, por lo que pedimos su colaboración y participación desinteresada en este proyecto, a fin de obtener un número suficiente de muestras que posibiliten la determinación de esos parámetros de referencia antes citados.

La colaboración solicitada consiste en la aportación de muestras de cabello de sus alumnos y el rellenar una pequeña ficha por cada una de las muestras, garantizándose por nuestra parte en todo momento la confidencialidad absoluta de los datos de todos los participantes en el estudio. Los detalles sobre la misma se recogen en el documento anexo a esta carta.

Por supuesto, estamos a su entera disposición para ampliar la información y cualquier detalle que sea de su interés relativo a este proyecto.

Agradeciéndoles de antemano su imprescindible colaboración, pues sin la misma, muchas veces proveniente de personas ajenas a la medicina como usted, no sería posible alcanzar la luz en el diagnóstico y conocimiento de las enfermedades, reciba un cordial saludo.

María Teresa Llorente Ballesteros

Facultativo Especialista en Análisis Clínicos

Anexo IV. Mediana e Intervalo de Referencia para los elementos traza

Elemento	Mediana	Intervalo de Referencia
		(Percentil 5 – Percentil 95)
Al (µg/g)	18.5	4.94 - 63.2
Fe (µg/g)	15.45	7.5 - 33.7
Se (µg/g)	0.46	0.20 - 4.94
Sr (µg/g)	1.29	0.20 - 6.74
Zn (µg/g)	121	37.69 - 261
Bi (µg/g)	0.013	0.288
Co (ng/g)	14.5	4.67 - 72.4
Ni (µg/g)	0.50	<0.195 - 1.74
Mn (ng/g)	328	115 - 940
Ag (ng/g)	196	32.0 – 1437
Mo (µg/g)	0.041	0.016 – 0.110
Cd (ng/g)	18.27	78.8
As (µg/g)	0.07	0.26

Cr (µg/g)	0.360	<0.276 – 0.98
Cu (µg/g)	25.7	1.39 – 188.8
Ba (µg/g)	0.50	1.79
Hg (µg/g)	0.97	3.95
Tl (ng/g)	0.28	1.19
Pb (µg/g)	0.7	4.28